

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

PROGRAMA DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

**“Recuperación de la subunidad β_1 de la Na^+ , K^+ -ATPasa desde
cuerpos de inclusión empleando nanotecnología”**

T E S I S

Que presenta

M. B. DANIELA ROA VELAZQUEZ

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**

Directores de la Tesis:

DRA. LIORA ZRIHEN NAHON DE SHOSHANI

DR. SALVADOR GALLARDO HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) por brindar las instalaciones y el ambiente que permitieron el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo económico a través de la beca de doctorado y por sus programas en favor del desarrollo social, científico y tecnológico de México.

Mi agradecimiento más sincero a la Dra. Liora Zrihen Nahon de Shoshani y al Dr. Salvador Gallardo Hernández por permitirme trabajar en sus grupos de investigación. Gracias por guiarme, por la confianza y el apoyo.

Agradezco sinceramente al Dr. Edgar Morales Ríos por abrirme las puertas de su laboratorio y por confiar plenamente en mí.

A mis asesores, al Dr. Daniel Bahena Uribe, al Dr. Jaime Ortega López, al Dr. Juan Pedro Luna Arias y a la Dra. Gloria de La Luz León Ávila, por sus consejos y por el tiempo que me brindaron.

Quiero agradecer a la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares por su apoyo en biología molecular y a la Dra. Claudia Benítez Cardoza por las mediciones en difracción circular.

A Miguel Avendaño Ibarra, Alejandra García Sotelo, Claudia Flores Pucheta, Georgina Ramírez, María Luisa Roldan, Rosalía Aguirre y a Enrique Alcaraz Pérez por su apoyo técnico.

A mis compañeros, Julio García, Jessica Filísola, Dan Zavala y a Juvenal Mendoza, por todo el trabajo en equipo. A Teresa López y Omar Páez por su amistad dentro y fuera del laboratorio.

Mi más sincero agradecimiento a Gabriel Marcelino Pérez por compartir los mejores momentos conmigo y por animarme.

Dedico esta tesis

A mi abuela,

María Velazquez Hernández (+),

Gracias por enseñarme respeto y humildad.

A mi madre ,

Margarita Roa Velazquez,

Gracias por el apoyo y comprensión.

A Gabriel Marcelino Pérez,

*Por su constante apoyo, por compartir su vida conmigo, por su
amistad y por su amor.*

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	3
1.1. LA NANOCIENCIA Y LA NANOTECNOLOGÍA.....	3
1.2. LAS PROTEÍNAS	4
1.2.1. Niveles de organización en la estructura de una proteína.....	7
1.2.1. Tipos de interacciones en una proteína.....	8
1.3. PROTEÍNA DE MEMBRANA.....	10
1.4. SISTEMAS DE EXPRESIÓN PARA PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	11
1.4.1. Producción de proteínas en <i>E. coli</i>	14
1.4.2. Cuerpos de inclusión bacterianos	15
1.5. LA Na^+ , K^+ -ATPASA.....	21
1.5.1. La Na^+ , K^+ -ATPasa de las células epiteliales	24
1.6. LA SUBUNIDAD β_1 DE LA NKA.....	24
1.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZACION EN LA N&N	28
1.7.1. Dispersión de luz dinámica.....	29
1.7.2. Espectroscopia Raman.....	29
1.7.3. Dicroísmo circular	30
CAPITULO II. JUSTIFICACIÓN	32
CAPITULO III. HIPÓTESIS	33
CAPITULO IV. OBJETIVOS	34
4.1. OBJETIVO GENERAL	34
4.1.1. Objetivos específicos.....	34
CAPÍTULO V. METODOLOGÍA	35
5.1. ETAPA 1: OBTENCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN.....	36
5.1.1. Clonación <i>IVA</i>	36
5.1.2. Clonación tradicional.....	39
5.2. ETAPA 2: PURIFICACIÓN Y REPLEGAMIENTO DEL $\text{ED}\beta_1$	41
5.2.1. Expresión del dominio extracelular de la subunidad β_1	42
5.2.2. Replegamiento en Ni^{2+} -IMAC del $\text{ED}\beta_1$	42
5.2.3. Replegamiento del $\text{ED}\beta_1$ por SEC	43
5.1.4. Análisis de Western blot.....	45
5.3. ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL $\text{ED}\beta_1$	45
5.3.1. Calibración de la columna Superdex 75	45
5.3.2. Microscopía de fuerza atómica.....	46
5.3.3. Dispersión de luz dinámica.....	46
5.3.4. Espectroscopia de dicroísmo circular	47

5.3.5. Espectroscopia Raman.....	47
5.4. ETAPA 4: ENSAYO DE INTERACCIÓN β_1 - β_1	47
CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
6.1. VECTORES DE EXPRESIÓN	50
6.1.1. Vector pRSET-ED β_1	50
6.1.2. Vectores pCri-ED β_1	53
6.2.3. Pruebas de expresión del ED β_1	58
6.2. PURIFICACIÓN Y REPLEGAMIENTO DEL ED β_1	59
6.2.1. Replegamiento en Ni ²⁺ -IMAC: vector pRSET-ED β_1	59
6.2.2. Replegamiento en cromatografía de exclusión por tamaño: vector pCri-8a-ED β_1 ...	63
6.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ED β_1	70
6.4. INTERACCIÓN β_1 - β_1 DEL ED β_1 REPLEGADO	80
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	84
PERSPECTIVAS	85
BIBLIOGRAFÍA.....	86
ANEXOS	100
ANEXO 1. CICLO CATALÍTICO DE LA BOMBA DE SODIO	100
ANEXO 2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS QUÍMICAMENTE COMPETENTES	102
ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA	104
ANEXO 4. PRUEBAS DE EXPRESIÓN DEL ED β_1 : pRSET-ED β_1	106
ANEXO 5: PREPARACIÓN DE GELES TRICINA-SDS-PAGE	108
ANEXO 6. PRODUCTIVIDAD DEL TRABAJO DE TESIS.....	109
ANEXO 7. PRODUCTIVIDAD ADICIONAL RELACIONADA CON EL PROYECTO COVID-19.....	110
ANEXO 8. PRODUCTIVIDAD ADICIONAL DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS	115
ANEXO 9. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del enlace peptídico en el dipéptido glicilalanina.....	6
Figura 2. Parámetros estructurales que describen el enlace peptídico.	6
Figura 3. Niveles estructurales de una proteína.....	7
Figura 4. Representación de las interacciones que intervienen en el plegado de una proteína.	9
Figura 5. Micrografías de microscopía electrónica de IBs.....	16
Figura 6. Modelos en cinta de la NKA.....	23
Figura 7. Imágenes confocales de inmunofluorescencia de la localización de la NKA en la membrana lateral en células epiteliales.....	26
Figura 8. Modelo de la predicción de la interfaz de interacción β_1 - β_1	28
Figura 9. Espectros característicos de CD de estructuras secundarias en proteínas.	31
Figura 10. Esquema general de la estrategia experimental.	35
Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la subunidad β_1	36
Figura 12. Esquema del diseño de primers <i>Forward</i> y <i>Reverse</i> usados en la PCR.	37
Figura 13. Esquema del In Vivo Assembly llevado a cabo por <i>E. coli</i> TOP10 (DH5 α).	38
Figura 14. Mapa del ED β_1 subclonado en el vector pRSET por el método de clonación IVA.	39
Figura 15. Mapa del vector pCri-1a-ED β_1	40
Figura 16. Mapa del vector pCri-4a-ED β_1	41
Figura 17. Mapa del vector pCri-8a-ED β_1	41
Figura 18. Geles de agarosa al 0.8 % de los productos de PCR empleados para la clonación IVA.....	50
Figura 19. Análisis de la construcción pRSET-ED β_1	51
Figura 20. Alineamiento múltiple con los datos de los cromatogramas de secuenciación del vector pRSET-ED β_1	52
Figura 21. Geles de agarosa al 0.8 % del amplificado por PCR y ADN plasmídico..	54
Figura 22. Geles de agarosa al 0.8 % de las reacciones de restricción con las enzimas NcoI y XhoI.	54
Figura 23. Reacción de doble restricción de los vectores obtenidos con el sistema pCri usando las enzimas NcoI y XhoI.....	55
Figura 24. Alineamiento de los datos de los cromatogramas de secuenciación del vector pCri-1a-ED β_1	56
Figura 25. Alineamiento de los datos de los cromatogramas de secuenciación del vector pCri-8a-ED β_1	57
Figura 26. Gel SDS-PAGE del análisis después de la lisis celular.....	58
Figura 27. Análisis de la prueba de expresión del ED β_1 con el sistema pCri.....	59
Figura 28. Gel SDS-PAGE del análisis del sobrenadante después de los lavados de los IBs.....	61
Figura 29. Cromatogramas de Ni ²⁺ -IMAC del replegamiento por doble gradiente..	62

Figura 30. Gel SDS-PAGE del replegamiento por doble gradiente usando buffers en ausencia de L-arginina.....	63
Figura 31. Gel SDS-PAGE de los sobrenadantes de los lavados de los IBs.	64
Figura 32. Caracterización de los IBs previo a ser solubilizados en urea.	64
Figura 33. Purificación de los IBs solubilizados.	65
Figura 34. Replegamiento de ED β_1 por SEC..	67
Figura 35. Replegamiento de ED β_1 por SEC..	68
Figura 36. Cromatograma de SEC con el perfil de elución de los estándares de peso molecular.....	68
Figura 37. Cromatogramas del efecto del gradiente de urea.	69
Figura 38. Curva de calibración de la columna Superdex 75.....	71
Figura 39. Medición del radio hidrodinámico del ED β_1 por DLS.....	72
Figura 40. Medición por DLS del radio hidrodinámico del ED β_1 en % de distribución por masa	72
Figura 41. Espectro Raman de ED β_1 plegado y solubilizado.....	74
Figura 42. Determinación de la estructura secundaria de ED β_1 recombinante	76
Figura 43. Modelos del ED β_1 representados en cinta.	77
Figura 44. Modelos en cinta del ED β_1 coloreados por el tipo de estructura secundaria.....	78
Figura 45. Determinación de la estructura secundaria de ED β_1 recombinante.	79
Figura 46. Ensayo de interacción β_1 - β_1	82
Figura 47. Controles en el ensayo de interacción β_1 - β_1	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aminoácidos según su tipo químico.	5
Tabla 2. Energías típicas de interacciones físicas en proteínas.	8
Tabla 3. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes más comunes.	13
Tabla 4. Secuencia de nucleótidos de los primers empleados en la PCR ₁	37
Tabla 5. Primers empleados en la PCR del ED β ₁ para la inserción en los vectores pCri.....	40
Tabla 6. Estándares usados para la calibración de la columna Superdex 75.....	69
Tabla 7. Rendimiento de purificación de ED β ₁ por 1 L de cultivo de <i>E. coli</i> procesado.....	70
Tabla 8. Asignación de picos de ED ₁ plegado en comparación con ED β ₁ solubilizado.	74
Tabla 9. Estimación de la estructura secundaria obtenida a partir de la CD del ED β ₁ plegado	78

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopio de fuerza atómica
AJs	Uniones adherentes
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CAM	Molécula de adhesión celular
CD	Espectroscopia de dicroísmo circular
CHO	Células derivadas de ovario de hámster chino
Cryo-EM	Microscopía crioelectrónica
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ED	Ectodominio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EYFP	Proteína fluorescente amarilla mejorada
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
FTIR	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier
GJs	Uniones comunicantes
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GuHCl	Clorhidrato de guanidina
H	Hidrogeno
IBs	Cuerpos de inclusión
IPTG	Isopropil β -D-galactopiranosido
MD	Dinámica Molecular
MDCK	Células de riñón canino de Madin-Darby
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MPs	Proteínas de membrana
N&N	Nanociencia y la nanotecnología

Ni ²⁺ -IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
NKA	Bomba de sodio
p. ej.	Por ejemplo
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pi	Fosfato inorgánico
pI	Punto isoeléctrico
PMFS	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Membrana de fluoruro de polivinilideno
RBS	Unión a ribosoma
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
S-S	Enlaces disulfuro
TBS	Tris <i>buffer</i> salino
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TJs	Uniones estrechas
TM	Dominio transmembrana
Tm	Temperatura de fusión
Vo	Volumen vacío

RESUMEN

La subunidad β_1 de la Na^+/K^+ -ATPasa es una proteína de membrana celular, que más allá de sus funciones clásicas, también es una molécula de adhesión celular. Las subunidades β_1 en la membrana lateral de las células epiteliales de riñón de perro interactúan en posición *trans* con las subunidades β_1 de otra célula vecina. La interacción β_1 - β_1 es esencial para la formación y estabilización de las uniones intercelulares. Estudios *in silico* y mutagénesis dirigida al sitio revelaron que la interfaz de interacción involucra los residuos 198-207 y 221-229. Sin embargo, es necesario reportar experimentalmente la interfaz de interacción a nivel estructural. En este trabajo, se describe la clonación, la sobreexpresión en *E. coli* y la purificación del dominio extracelular de la subunidad β_1 a partir de cuerpos de inclusión. Así como, la caracterización por cromatografía de exclusión por tamaño. El análisis del radio hidrodinámico de la proteína por DLS indicó que la proteína se replegó con el tamaño esperado. Los resultados de dicroísmo circular y espectroscopia Raman revelaron que las estructuras secundarias en la proteína plegada son de tipo β -hoja, α -hélice y del tipo aleatoria (*loops*). Además, al comparar estos datos experimentales del CD con un modelo generado en Alphafold2 se encontró que los datos son muy similares. También se realizaron ensayos de interacción β_1 - β_1 con la proteína recombinante, los cuales sugirieron la formación de dímeros (6xHis β_1 - β_1). Dadas las evidencias obtenidas, concluimos que, tanto el plegamiento, como la función del dominio extracelular recombinante de la subunidad β_1 es muy similar a la proteína nativa, por lo que el trabajo futuro en nuestro laboratorio tendrá como objetivo caracterizar a nivel atómico la interfaz de interacción entre ED β_1 .

ABSTRACT

The β_1 subunit of Na^+/K^+ -ATPase is a cell membrane protein, which, beyond its classical functions, is also a cell adhesion molecule. β_1 subunits on the lateral membrane of dog kidney epithelial cells interact in the *trans*-position with β_1 subunits of the same species from another neighboring cell. The β_1 - β_1 interaction is essential for the formation and stabilization of intercellular junctions. Previous site-directed and *in silico* mutagenesis studies revealed that the interaction interface involves residues 198-207 and 221-229. However, it is necessary to report the interaction interface at the structural level experimentally. In this work, we are describing the cloning, overexpression in *E. coli* and purification of the extracellular domain of the β_1 subunit from inclusion bodies. As well as the experimental characterization by size exclusion chromatography. Analysis of the hydrodynamic radius of the purified protein by DLS indicated that the protein was refolded. Circular dichroism and Raman spectroscopy results revealed that the secondary structures in the folded protein were of the β -sheet, α -helix, and loops. In addition, when comparing the secondary structure experimental data from the CD with a model generated in AlphaFold2, found that the data are very similar. Finally, we also found β_1 - β_1 interaction by measuring the formation of hetero-dimers (6xHis β_1 - β_1). Given the evidence obtained, we conclude that the fold and activity of the recombinant extracellular domain of the β_1 subunit is highly similar to the native protein. Hence, the future work in our laboratory aims to characterize the interaction interface at the atomic level.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. La nanociencia y la nanotecnología

La nanociencia es el estudio de sistemas y procesos con al menos una dimensión nanométrica (10^{-9} m) (Murty *et al.*, 2013; Rafique *et al.*, 2020). Por su parte, la nanotecnología es la aplicación de la nanociencia, se encarga del diseño, síntesis, caracterización y aplicaciones de materiales, dispositivos y sistemas con dimensiones entre 1-100 nm (Zhu *et al.*, 2021), además, de la explotación de nuevos fenómenos y propiedades físicas, químicas y biológicas en esta escala (Murty *et al.*, 2013). El término nanotecnología fue acuñado por primera vez en 1974 por Norio Taguchi (Murty *et al.*, 2013), pero en el año de 1959 Richard Feynman dio una conferencia acerca de nanotecnología, lo que dio pie a un gran debate entre los científicos contemporáneos acerca de las posibilidades o imposibilidades de manipular y controlar los materiales a escala molecular. En esta conferencia Feynman también mencionó que un sistema biológico puede ser extremadamente pequeño y que las células eran capaces de fabricar sustancias, moverse y realizar un sin fin de cosas, todas en una escala muy pequeña, incluyendo almacenar información. Aquí mismo, se planteó la posibilidad de producir algo muy pequeño que se pudiera manipular al nivel que lo hacen las células (Gazit & Mitraki, 2013). Actualmente, una de las perspectivas más interesantes de la nanociencia y la nanotecnología (N&N) es inspirarse o utilizar directamente las herramientas y los procesos que la naturaleza ha desarrollado a lo largo de millones de años mediante procesos evolutivos (Murty *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista biológico, las investigaciones en N&N pueden realizarse a nivel celular. Las células tienen una organización funcional con productos a nanoescala, son capaces de construir estructuras desde un enfoque “*Bottom-up*” (ascendente), en donde a través del autoensamblaje se diseñan y construyen nanoestructuras. Un ejemplo son los ácidos nucleicos, tienen la capacidad para almacenar información y autoensamblarse. Actualmente el ADN (ácido desoxirribonucleico) origami aprovecha estas características para formar estructuras complejas de dos y tres dimensiones (Zhang *et al.*, 2014). Las proteínas también son un buen ejemplo, porque presentan capacidades estructurales y funcionales únicas a nanoescala (Curnow, 2009), estas se autoensamblan a partir de polímeros de aminoácidos codificados por ADN y se pueden producir proteínas con una actividad biológica específica (Renugopalakrishnan & Lewis, 2006). Por lo

tanto, se puede decir que las proteínas son los dispositivos más pequeños de una célula que muestran una sensible adaptación a su entorno mediante la producción de un comportamiento adecuado ante un estímulo específico, este hecho califica a las proteínas como nanomáquinas (Herman & Lee, 2021). En este sentido, han surgido dos subdisciplinas para abordar a mayor profundidad estudios relacionados con la célula; la “nanobiotecnología” y la “bionanotecnología”. La primera está relacionada con la aplicación de principios y herramientas a nanoescala para el estudio del mundo biológico o para aplicaciones biológicas muy específicas. Mientras tanto, la “bionanotecnología” está inspirada y guiada por los biosistemas, el cual puede ser desde el uso de bloques de construcción biológicos, como carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, hasta el uso de proteínas (actividad biológica y reconocimiento) para aplicaciones nanotecnológicas que no necesariamente están asociadas con la biología (Gazit & Mitraki, 2013; Lee & Moon, 2020).

1.2. Las proteínas

Todos los organismos desde las bacterias más simples hasta los mamíferos tienen decenas de miles de proteínas diferentes como parte de su arsenal molecular (Gazit & Mitraki, 2013). Sus funciones pueden ser estructurales, catalíticas o de transducción de señales (Renugopalakrishnan & Lewis, 2006), entre muchas otras. Los bloques de construcción básicos a partir de los cuales se forman las proteínas son los aminoácidos (**Tabla 1**), estos se unen a través del enlace peptídico para formar una cadena polipeptídica. El enlace tiene carácter covalente y se da por la asociación entre dos aminoácidos consecutivos entre el extremo carboxilo de un aminoácido y el extremo amino de otro, en el proceso se elimina una molécula de agua (**Figura 1**) y se repite varias veces en la etapa de elongación durante la síntesis ribosomal. La cadena polipeptídica se conoce también como esqueleto o cadena principal, la cual tiene una cadena lateral (R) por residuo de aminoácido. Los átomos que forman parte de la cadena principal es el grupo NH, el carbono alpha (C_{α}) y el carbono carbonílico simultáneamente unido al NH del siguiente residuo (**Figura 2**), por lo tanto, consta de unidades repetitivas de $\cdots N - C_{\alpha} - C - N - C_{\alpha} - C \cdots$. Además, las proteínas tienen dos grupos terminales, el amino terminal ($-NH_3^+$) denotado por N y el carboxilo terminal ($-CO_2^-$) denotado por C (Frauenfelder, 2010). Una de las características más importantes del enlace peptídico es que los átomos que lo forman tienen una geometría plana debido al carácter de doble enlace en un 40 % lo que representa una limitación de rotación o movimiento, por esta razón, el

enlace en su mayoría tiene una configuración *trans* con un ángulo de torsión ω cercano a 180° , en algunos casos especiales está presente la configuración *cis* ($\omega = 0^\circ$). La cadena principal tiene dos grados de libertad de rotación en torno a los enlaces $C_\alpha-N$ (ϕ) y $C_\alpha-C$ (ψ), que sirven de punto de unión entre los distintos planos que componen el esqueleto de la proteína. Al ángulo conformacional que se forma entre los enlaces se les llama phi (ϕ) y psi (ψ). La libertad conformacional es clave en la disposición espacial de la estructura proteica. En la **Figura 2** se muestra la geometría plana (cuadro azul claro) del enlace peptídico, se identifican los ángulos conformacionales y las distancias entre los átomos.

Tabla 1. Aminoácidos según su tipo químico. Se enlistan por nombre, tipo de abreviatura, y cadena lateral (Frauenfelder, 2010).

Aminoácidos	Símbolo	Letra única	Grupo R de cadena lateral	Estructura de la cadena lateral R
Glicina	Gly	G	Hidrocarburo alifático	H-
Alanina	Ala	A		CH ₃ -
Valina	Val	V		(CH ₃) ₂ CH-
Isoleucina	Ile	I		(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂ -
Leucina	Leu	L		(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂ -
Fenilalanina	Phe	F	Hidrocarburo aromático	C ₆ H ₅ CH ₂ -
Tirosina	Tyr	Y		HOC ₆ H ₅ CH ₂ -
Triptófano	Trp	W		C ₆ H ₄ HNHC=CH ₂ -
Serina	Ser	S	Alcohol	HOCH ₂ -
Treonina	Thr	T		HOCH (CH ₃)-
Cisteína	Cys	C	Tiol	HSCH ₂ -
Metionina	Met	M	Sulfuro	H ₃ CSCCH ₂ CH ₂ -
Asparagina	Asn	N	Amida	H ₂ NCOCH ₂ -
Glutamina	Gln	Q		H ₂ NCOCH ₂ CH ₂ -
Arginina	Arg	R	Bases	HN=C (NH ₂) NH(CH ₂) ₃ -
Lisina	Lys	K		H ₂ N(CH ₂) ₄ -
Histidina	His	H		HN=CHNH-
Ácido aspártico	Asp	D	Ácido	HOOCCH ₂ -
Ácido glutámico	Glu	E		HOOCCH ₂ CH ₂ -
Prolina	Pro	P	Amina secundaria	H ₂ CCH ₂ CH ₂ -

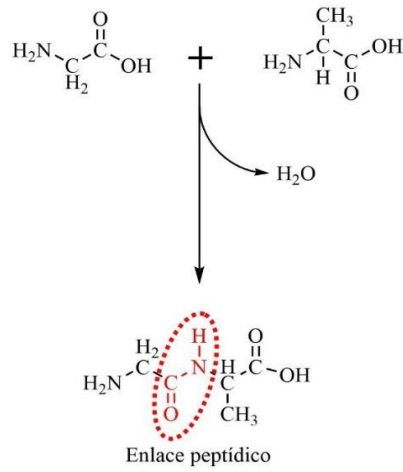


Figura 1. Representación del enlace peptídico en el dipéptido glicilalanina.

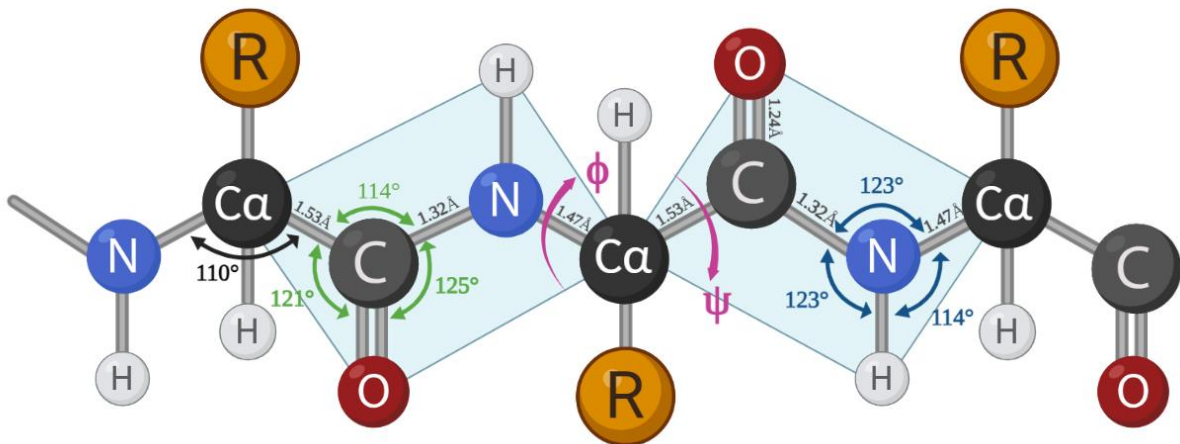


Figura 2. Parámetros estructurales que describen el enlace peptídico. La planaridad del enlace en cuadro azul claro, se indican las distancias entre cada átomo y los ángulos alrededor del carbono carbonilo y el nitrógeno. Se hace la distinción de los ángulos diedros (ϕ y ψ) alrededor del carbono α .

1.2.1. Niveles de organización en la estructura de una proteína

Las proteínas muestran cuatro diferentes niveles de estructura (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria), la **Figura 3** ejemplifica estos niveles estructurales. La estructura primaria esta definida por una secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y cualquier modificación postraduccional¹. La estructura secundaria se refiere a fragmentos en las proteínas que presentan un patrón de plegamiento de la cadena polipeptídica, aquí se presentan patrones repetitivos y ordenados, los tipos principales son α -hélices, β -láminas, giros y bucles, estas estructuras generalmente se definen por los ángulos diedros característicos (ϕ y ψ) y por patrones regulares de enlaces de hidrógeno en la cadena principal. La estructura terciaria es ya considerada la forma plegada y tridimensional (3D) que está construida de interacciones entre las estructuras secundarias. Por último, la estructura cuaternaria es la disposición espacial precisa de las subunidades dentro de una proteína (>100 kDa), son oligómeros que consisten en más de una cadena polipeptídica (Kuhar *et al.*, 2021; Lee & Moon, 2020; Sun *et al.*, 2004).

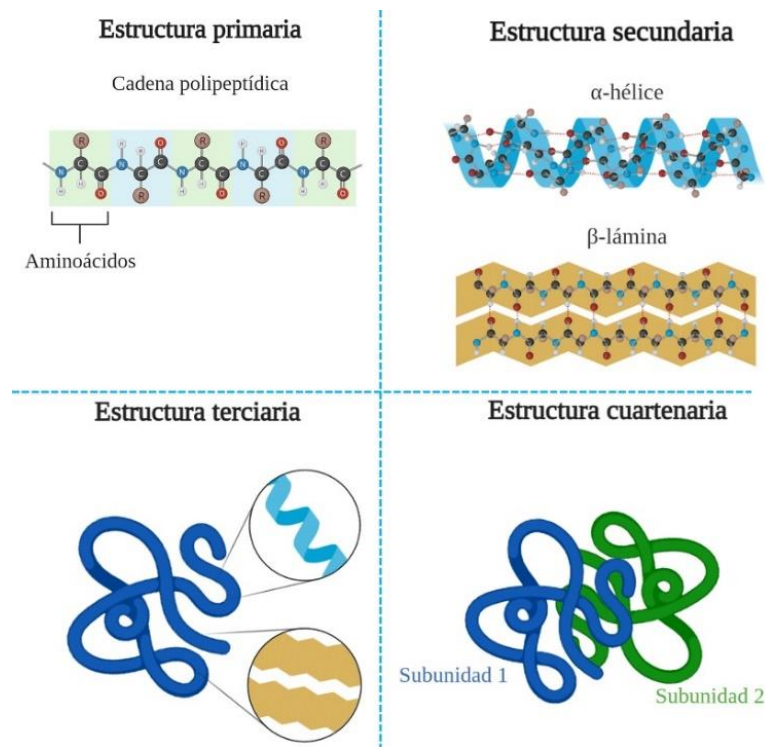


Figura 3. Niveles estructurales de una proteína.

¹ Modificaciones postraduccionales: modificaciones covalentes de la estructura de una proteína.

1.2.1. Tipos de interacciones en una proteína

El plegamiento es un proceso mediante el cual una proteína obtiene su estado funcional nativo a partir de una cadena polipeptídica no estructurada. Se conoce al estado nativo generalmente a la estructura 3D única y bien definida de una proteína (Campos, 2022; Silvers *et al.*, 2011). Una cadena polipeptídica (1D) que emerge del ribosoma debe hacer un gran número de contactos e interacciones para plegarse a su estructura correcta, cada una de ellas del orden de picosegundos de duración. El plegado de una proteína depende de interacciones no covalentes específicas e inespecíficas que aseguran la estabilización de la estructura terciaria. Las interacciones no covalentes inespecíficas son esencialmente interacciones no polares (hidrofóbicas) y de van der Waals que son importantes para impulsar el proceso de plegado. Las interacciones específicas son del tipo electrostáticas, comprenden puentes salinos y enlaces de hidrógeno, que son fundamentales para el plegamiento, la conformación estructural y la dinámica de las proteínas (Gazit & Mitraki, 2013; Lee & Moon, 2020). En la **Tabla 2** se muestran las interacciones presentes en una proteína y la energía típica de cada una de ellas (Gomes & Faísca, 2019) y en la **Figura 4** se representan estas interacciones.

Tabla 2. Energías típicas de interacciones físicas en proteínas (Gomes & Faísca, 2019).

Interacción	Energía (kJ/mol)
van de Waals	1
Enlace de hidrogeno	8-29
Electrostática	17-50
No polar (hidrofóbicas)	60-80
Enlace disulfuro (S-S)	250
Enlace covalente simple	200-500

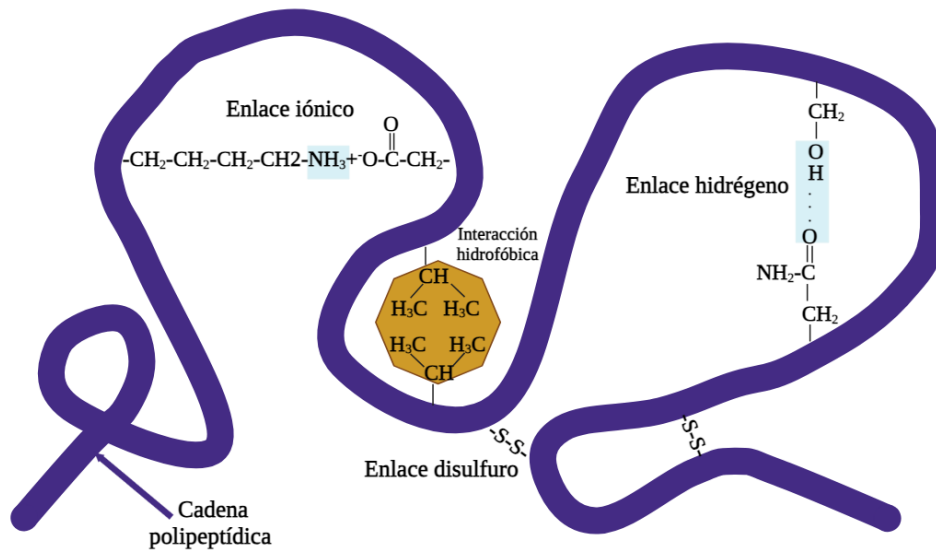


Figura 4. Representación de las interacciones que intervienen en el plegado de una proteína.

Las interacciones de van der Waals surgen cuando un átomo con carga parcial está cerca de uno sin carga, provocando una redistribución instantánea de la densidad electrónica, lo que resulta en una interacción de atracción débil (1 kJ/mol) entre los átomos vecinos. Esta interacción sucede tanto en grupos polares como no polares, son muy débiles individualmente, pero fuertes colectivamente y de corto alcance, por consiguiente, están estrechamente acopladas al empaquetamiento hidrofóbico de una proteína. Por su parte, los enlaces de hidrógeno (H) se establecen entre dos átomos electronegativos con un hidrógeno intermedio. En el exterior de una proteína, los grupos peptídicos se unen con el hidrógeno de las moléculas de agua circundante, mientras que, dentro de una proteína, los grupos peptídicos se unen con el hidrógeno a otro grupo peptídico o a una molécula de agua que está dentro del núcleo de la proteína. La mayoría de los grupos CO y NH de la cadena principal (90 %) están unidos por enlaces de hidrógeno, lo que favorece la organización interna y limita las conformaciones proteicas. Los enlaces de hidrógeno en las proteínas son direccionales ya que su fuerza depende de la orientación del dipolo, que van desde 8 a 29 kJ/mol. Esta es una característica muy importante ya que proporciona especificidad para la interacción. Además, los enlaces de H contribuyen a determinar la estabilidad estructural de la estructura terciaria de una proteína (Gomes & Faísca, 2019).

Las interacciones electrostáticas son interacciones carga-carga establecidas entre iones permanentemente cargados y se extienden a distancias significativas. En su mayoría involucran grupos polares de cadenas laterales. Sin embargo, los átomos del esqueleto polipeptídico están parcialmente cargados y también pueden participar en interacciones atractivas y repulsivas. Por otro lado, los puentes salinos se forman dentro del mismo dominio o elemento estructural secundario, contribuyen a la estabilidad de la proteína al restringir los movimientos de la cadena principal. Otra interacción importante que impulsa el plegamiento de proteínas son las hidrofóbicas que se establecen entre las cadenas de aminoácidos no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro y Met) en el interior de las proteínas. Estos se forman para minimizar la exposición de las regiones no polares a las moléculas de agua que rodean a las proteínas y brindan una importante contribución estabilizadora. Para finalizar, los enlaces disulfuro (S-S) son interacciones que se establecen entre cadenas laterales oxidadas de residuos de cisteína (Gomes & Faísca, 2019).

1.3. Proteína de membrana

Las proteínas de membrana (MPs) están asociadas con la membrana de una célula o un orgánulo en particular, representan aproximadamente el 30 % del marco abierto de lectura² del genoma de un organismo y desempeñan funciones cruciales, incluida la transducción de señales, la producción de energía (ATP sintasas), el transporte específico y no específico de solutos y iones (bombas, transportadores y canales), la regulación osmótica (porinas), la absorción de nutrientes y la comunicación célula-célula (Almeida *et al.*, 2017; Moraes *et al.*, 2014; van der Spoel *et al.*, 2015). Estas proteínas se caracterizan normalmente por tener al menos un dominio transmembrana (TM). Además, se les considera como un medio de comunicación entre dos entornos distintos separados por una bicapa lipídica. La mayoría tiende a formar dímeros (homo o heterodímeros) u oligómeros de orden superior estableciendo contactos entre TM específicos (Almeida *et al.*, 2017). Se clasifican en proteínas de membrana periféricas e integrales, que se asocian en diversos grados con la bicapa lipídica. Las primeras interactúan con la superficie de la membrana de forma no covalente por medio de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno. Por su parte, las

² Marco abierto de lectura: En genómica, es una porción de una secuencia de ADN que no incluye un codón de terminación (que funciona como una señal de detención) (Recuperado en mayo 2023 de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Marco-abierto-de-lectura>)

proteínas integrales de membrana están asociadas fuertemente con la membrana e interactúan de forma hidrofóbica con fosfolípidos de la bicapa. Cabe mencionar que las proteínas integrales de membrana a su vez se clasifican en Tipo I (su extremo carboxilo está del lado del citosol o citoplasma) o en Tipo II (el extremo amino está hacia el citosol) (Almeida *et al.*, 2017).

Debido a las diferentes funciones que desempeñan las MPs es fundamental comprender de manera integral su estructura y función. A la fecha, más de 750 estructuras de proteínas de membrana se han resuelto mediante varios métodos experimentales, como la resonancia magnética nuclear (RMN), cristalografía de rayos X y la microscopía crioelectrónica (Cryo-EM, por sus siglas en inglés) se encuentran disponibles en el *Protein Data Bank* (Almeida *et al.*, 2017; Moraes *et al.*, 2014). Su análisis representa un importante desafío técnico y existen varias razones por la que su purificación es más difícil que la de proteínas solubles. En primer lugar, las cantidades de MPs purificadas a partir de los sistemas endógenos es relativamente baja, por lo general, se requieren cantidades de 0.1 a 10 mM de proteína purificada, homogénea y correctamente plegada para las investigaciones estructurales de RMN y de cristalografía de Rayos X. Una opción para obtener un mayor rendimiento de proteína es mediante su sobreexpresión utilizando sistemas heterólogos como bacterias, levaduras, células de mamíferos o insectos (Curnow, 2009; Murty *et al.*, 2013). Las primeras estructuras de proteínas de membrana expresadas en *E. coli* fueron el canal de MscL (canal de conductividad mecanosensible) de *Mycobacterium tuberculosis* y KcsA (canal de potasio) de *Streptomyces lividans*. Igualmente, las primeras MPs de mamífero recombinantes se resolvieron en 2005, la Ca²⁺-ATPasa de conejo se produjo en *Saccharomyces cerevisiae* y el canal de iones de potasio de rata (Kv1.2) fue producido en *Pichia pastoris*. En el presente escrito se reportan resultados relacionados con la subunidad β_1 de la Na⁺, K⁺-ATPasa de perro, en la sección 1.5 abordaremos acerca de esta proteína de membrana.

1.4. Sistemas de expresión para proteínas recombinantes

La producción de proteínas en sistemas de expresión heterólogos es debido a la imposibilidad de obtener rendimientos satisfactorios a partir de las fuentes naturales (Walker, 2015) y un cuello de botella importante en los estudios estructurales, bioquímicos y biofísicos de proteínas, ya que se tiene la necesidad de obtener una cantidad considerable de

material homogéneo (Goulas *et al.*, 2014). En la sobreexpresión de MPs especialmente de origen eucariota es clave encontrar un sistema de expresión ideal y realizar la optimización de la sobreexpresión posterior. La tecnología del ADN recombinante permite la síntesis de prácticamente cualquier secuencia polipeptídica. La selección adecuada del sistema de expresión depende del nivel de productividad, el fin y de las características fisicoquímicas de la proteína. Las alternativas incluyen el uso de bacterias, levaduras, plantas y células de insectos o mamífero, incluso, la aplicación de sistemas libres de células (Kaur *et al.*, 2018; Kwon *et al.*, 2019; Renugopalakrishnan & Lewis, 2006; Walker, 2015). En la **Tabla 3** se resumen a los sistemas de expresión para proteínas recombinantes junto con sus características, inconvenientes y ejemplos estándar. Particularmente para la expresión de proteínas de membrana los sistemas más utilizados son *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. En menos ocasiones *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Schizosaccharomyces pombe* (Dilworth *et al.*, 2018)

Tabla 3. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes más comunes (Dilworth et al., 2018; Reena et al., 2016; Walker, 2015).

Sistema de expresión	Tipo/ejemplos	Características	Inconvenientes
Eucariota	Células de mamífero / HEK-293 (riñón embrionario humano), CHO (ovario de hámster chino), BHK (riñón de hámster bebé), etc.	<ol style="list-style-type: none"> 1) Modificaciones postraduccionales y plegamiento adecuado. 2) Reconocen apropiada y eficientemente las señales para la síntesis, el procesamiento y la secreción de proteínas eucariotas. 3) Líneas celulares estables o con expresión genética transitoria (TGE). 4) Cultivo en monocapa o en solución. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Alto costo de producción y bajas tasas de crecimiento. 2) Contaminación potencial con virus animales y bacterias. 3) Las líneas estables tienen un proceso que tarda varios meses. 4) La glicosilación entre líneas celulares es diferente. 5) Bajos rendimientos de proteína pura.
	Células de insecto / Sf 9, Sf 21, Hi5, etc.	<ol style="list-style-type: none"> 1) Modificaciones postraduccionales similares a las de mamíferos. 2) Sistema de expresión de baculovirus 3) Altos niveles de expresión (1-500 mg/L de cultivo). 4) Más resistentes al estrés y fáciles de manejar en comparación con sistemas de mamíferos. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Tasa de crecimiento lenta. 2) Condiciones de cultivo exigentes. 3) Proceso de infección lítica limitado.
	Levaduras/ <i>Saccharomyces cerevisia</i> , <i>Pichia pastoris</i> y <i>Hansenulla polymorpha</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Modificaciones postraduccionales. 2) Puede secretar proteínas correctamente plegadas y procesadas. 3) Producción de proteínas de hasta 1400 aminoácidos (~150 kDa). 4) Cepas con vías de glicosilación humanizadas o deficientes de proteasas. 5) Para la producción de proteínas eucariotas complejas. 6) Producción económica, altas tasas de crecimiento y niveles de expresión, y fácilmente escalables. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Hiperglicosilación de proteínas (glicano hipermanosilado).
	Hongos filamentosos / <i>Trichoderma</i> .	<ol style="list-style-type: none"> 1) Rendimientos de producción de hasta de 100 g/L de proteína. 2) La celulosa funciona como fuente de nutrición y de inducción. 3) Modificación postraducciona similar a la de mamíferos. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) No se tiene amplio conocimiento de su fisiología y genética en comparación con las bacterias.
	Microalgas / <i>Chlamydomonas</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Volvox</i> , <i>Haematococcus</i> , <i>Dunaliella</i> r	<ol style="list-style-type: none"> 1) Son fotoautótrofas, solo requieren luz, agua y nutrientes básicos para su cultivo. 2) Cultivos líquidos a gran escala y alta tasa de crecimiento. 3) Modificaciones postraduccionales de las plantas. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Bajos rendimientos de proteína recombinante. 2) Contaminación por bacteriana en el cultivo.
Procariota	Bacterias / <i>E. coli</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Alto nivel de expresión de proteína recombinante. 2) Multiplicación celular rápida. 3) Requisito de medios simples. 4) Amplio conocimiento de su genética. 5) Proteínas con menos de 100 kDa. 6) Cepas optimizadas para la expresión de proteínas. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Formación de cuerpos de inclusión. 2) Falta de modificaciones postranscripcionales; 3) Incapacidad de formar enlaces disulfuro en el citoplasma.

1.4.1. Producción de proteínas en *E. coli*

E. coli es un sistema de expresión rápido, rentable y de alto rendimiento para la obtención de proteínas recombinantes. Esta bacteria Gram negativa tiene una alta tasa de crecimiento, permite tener un sistema de inducción controlado de la proteína de interés y un amplio conocimiento de su genoma (Moghadam *et al.*, 2015), lo que ha permitido el desarrollo de nuevas cepas especializadas que portan mutaciones o plásmidos que coexpresan proteínas que favorecen la expresión a nivel transcripcional o traduccional. Sin embargo, en algunos casos la producción de proteínas, principalmente de membrana se conduce a la formación de partículas agregadas insolubles conocidas como cuerpos de inclusión (IBs) (Dilworth *et al.*, 2018). En un intento por minimizar la formación de IBs y favorecer la producción de proteínas solubles se han desarrollado muchas estrategias que incluyen la optimización de codones, la coexpresan con chaperonas moleculares y el uso de etiquetas de fusión. Así como, probar con muchas variables como la limitación de fuentes de carbono, concentración del inductor, el método de cultivo (fermentación por lotes o lotes alimentados), la composición del medio de crecimiento y las condiciones de cultivo (temperatura, agitación, aireación y densidad óptica de la bacteria). Todas estas variables pueden afectar los niveles de producción, el plegamiento de proteínas, la solubilidad y la actividad proteolítica de la bacteria (Goulas *et al.*, 2014; Rinas *et al.*, 2017).

Una chaperona es una "acompañante molecular" que las células requieren para prevenir y/o revertir las interacciones incorrectas que pueden ocurrir cuando las superficies potencialmente interactivas de otras macromoléculas se exponen al entorno intracelular saturado (Ellis, 2006; Gomes & Faísca, 2019; Kaur *et al.*, 2018). Una de las estrategias para mejorar la solubilidad de las proteínas es el uso de etiquetas de fusión, que tienen como objetivo mejorar el plegamiento de la proteína al promover la adquisición de la estructura correcta, mejorar la solubilidad, proteger de la proteólisis intracelular, neutralizar la toxicidad de la proteína para el huésped y facilitar la purificación de la proteína. La adición de una etiqueta de histidina es la estrategia más popular para la purificación a gran escala y es común usarla con otras etiquetas. Independientemente del sistema de expresión utilizado, la ubicación de la etiqueta de histidina se favorece por igual en el N-terminal o C-terminal de la proteína de interés. Las etiquetas que pueden aumentar la solubilidad de la proteína recombinante son la proteína de unión a maltosa (MBP), la glutatión-S-transferasa (GST), la tiorredoxina (Trx) y la proteína A sustancia utilización-N (NusA). Otras proteínas comúnmente utilizadas son el modificador pequeño similar a ubiquitina (SUMO), la proteína portadora de biotina carboxilo (BCCP), la proteína

fluorescente verde (GFP) (Kaur *et al.*, 2018; Roca-Pinilla *et al.*, 2020). Las etiquetas de fusión generalmente se eliminan después de la purificación y esto se logra mediante la incorporación de sitios de escisión específicos entre la etiqueta de fusión y la proteína recombinante, lo que facilita la proteólisis.

Particularmente la MBP es una proteína de 42 kDa codificada por el gen *malE* de *E. coli* K12. Se han utilizado para la purificación en un solo paso por afinidad con la amilosa entrecruzada. Puede aumentar la solubilidad de las proteínas, especialmente las proteínas eucariotas expresadas en bacterias. Al igual que disminuir la toxicidad y mejorar el nivel de expresión. Pese a estas mejoras, se ha observado en algunas ocasiones que la incisión de la etiqueta de fusión da como resultado una baja solubilidad y estabilidad, por lo que se opta por realizar mediciones directas para los análisis estructurales, con excepción de la RMN ya que la MBP es muy grande y no es adecuado hacer directamente la medición. Por otro lado, la etiqueta GST tiene un peso de alrededor de 26 kDa y tiene la función de proteger contra la proteólisis intracelular, estabiliza a la proteína en la fracción soluble y ayuda en la purificación. Por otra parte, la etiqueta Trx (11 kDa) ayuda en el replegamiento de proteínas que requieren un entorno reductor (Goulas *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2018).

1.4.2. Cuerpos de inclusión bacterianos

Los cuerpos de inclusión (IBs) son agregados no cristalinos que forman nanopartículas proteicas naturales que van desde 0.5 a ~800 nm (Rinas *et al.*, 2017). Tienen la característica de ser insolubles en agua, ser porosos y mecánicamente estables ya que pueden resistir condiciones duras de lisis celular por sonicación o homogeneización a alta presión (*French pressure cell press*), así como, la liofilización o el almacenamiento a largo plazo en diferentes condiciones. Están principalmente formados por la proteína de interés con hasta un 99 % y son más densos (~1.3 mg/mL) que muchos otros componentes celulares lo que facilita su separación mediante centrifugación después de una lisis celular (Choi *et al.*, 2014; Roca-Pinilla *et al.*, 2020). Para no volverse tóxicos, las propias bacterias los almacenan en el citoplasma o periplasma, aumentando considerablemente la concentración local, preferentemente en la región polar, ya sea en ambos polos o en el polo más antiguo después de la división celular (Curtis-Fisk *et al.*, 2008; Lebendiker & Danieli, 2014; Prasad *et al.*, 2011; Rinas *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2015). Los IBs vistos por microscopía electrónica de transmisión

(TEM) aparecen como áreas electrodensas, en la **Figura 5A** se aprecian estas áreas en gris oscuro y la **Figura 5B** corresponde a una imagen de microscopía electrónica de barrido (MEB) de IBs purificadas con una forma pseudo esférica reportados por Rinas *et al.* (2017).

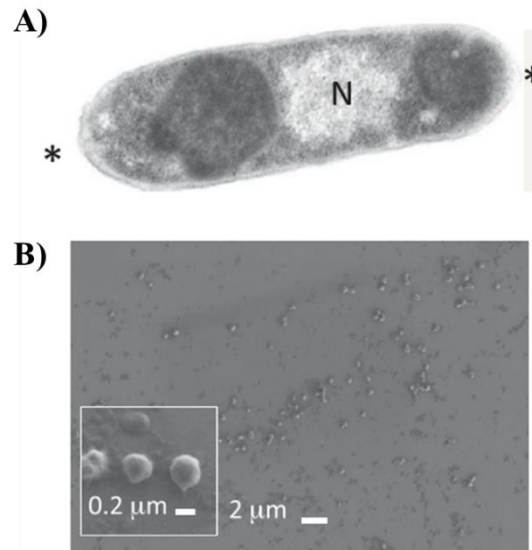


Figura 5. Micrografías de microscopía electrónica de IBs. A) micrografía de TEM, las áreas electrodensas corresponden a los IBs dentro de la bacteria *E. coli* MC4100, en la misma imagen se indican los extremos polares (*) y la región nuclear (N). B) Microscopía de MEB de IBs purificadas. Las imágenes fueron tomadas del reporte de Rinas *et al.* (Rinas *et al.*, 2017).

Dentro de la composición de los IBs pueden quedar atrapadas cantidades menores de otras moléculas durante su formación, incluyendo chaperonas, ácidos nucleicos (ADN plasmídico y ARN ribosómico) y las proteínas endógenas de la bacteria (p. ej. proteínas ribosómicas). Asimismo, depende de las condiciones de fermentación, los antecedentes genéticos del huésped y los procedimientos de purificación de IBs. Este último, se refiere a los componentes de la pared celular liberados durante la lisis celular, principalmente fosfolípidos o proteínas de membrana (p. ej. OmpF, OmpC y OmpA), las cuales pueden llegar a coprecipitar durante su aislamiento (Krachmarova *et al.*, 2020; Rinas *et al.*, 2017). Dado que los IBs son acumulados por la bacteria en el citoplasma, se ha propuesto que el proceso de formación es pasivo, ya que una consistencia vítrea del citoplasma no permite el movimiento de partículas grandes (>30 nm). En la literatura se menciona que la formación

de IBs altera la estructura vítrea del citoplasma (Rinas *et al.*, 2017). La consistencia fluida es más favorable ya que permite el movimiento de partículas más grandes (>30 nm) involucrando la hidrólisis de ATP.

La formación de IBs en las bacterias comienza inmediatamente después de la inducción de la expresión génica y se atribuye a la alta concentración de cadenas polipeptídicas que emergen de los ribosomas, plegamiento ineficiente (Rinas *et al.*, 2017), al origen de la proteína recombinante (especialmente las virales o de mamífero) (Rodríguez-Carmona *et al.*, 2010), al tamaño de la proteína, punto isoeléctrico (pI), la presencia de regiones hidrofóbicas específicas en la molécula y a la cantidad limitada de chaperonas y proteasas bacterianas que afectan el plegamiento o la degradación de los polipéptidos desplegados o mal plegados (Krachmarova *et al.*, 2020; Rinas *et al.*, 2017). Algunos investigadores asumen que la agregación de proteínas *in vivo* ocurre simultáneamente con la síntesis de proteínas (Krachmarova *et al.*, 2020) y que, de hecho, se puede decir que los IBs están formados a través de interacciones moleculares proteína-proteína bajo un comportamiento de tipo amiloide (Rodríguez-Carmona *et al.*, 2010).

La cinética de la formación de IBs se puede describir como proceso de pseudo-primer-orden que puede iniciar por dos posibles mecanismos (Rinas *et al.*, 2017). El primero trata a los IBs como cúmulos de agregados en los que los de menor tamaño tienden a ensamblarse para dar lugar a agregados de mayor tamaño (Rinas *et al.*, 2017; Upadhyay *et al.*, 2012). En el segundo, cada IBs se forma por un único o un limitado número de moléculas (proteínas) que actúan como sitios de nucleación. Como estos sitios de nucleación son entidades termodinámicamente estables, se favorece la adición de monómeros hasta formar agregados de mayor tamaño (Upadhyay *et al.*, 2012), este mecanismo se ha usado para describir la formación de amiloides en *E. coli* (Rinas *et al.*, 2017). Como ejemplo representativo, se encuentra el péptido A β 42 que está presente en las placas seniles (depósitos amiloides) de la enfermedad de Alzheimer, el cual fue expresado en *E. coli* BL21 (DE3) como modelo de estudio para comprender la formación de IBs dado que tiene un comportamiento similar a los amiloides nativas (Villar-Piqué *et al.*, 2016).

Los estudios *in vivo* en la formación de IBs también han proporcionada información acerca del control en la distribución de tamaño. El tamaño se puede controlar seleccionando el tiempo de recolección después de la inducción de la síntesis de proteínas ya que crecen progresivamente durante este tiempo (Rinas *et al.*, 2017), esto también va de la mano con las condiciones de cultivo e inducción

(Rodríguez-Carmona *et al.*, 2010). Dentro de las condiciones de cultivo, la temperatura puede definir el tipo de IBs que se obtengan; los IBs no clásicos se obtienen con temperaturas bajas y están formados mayormente por proteínas activas (Upadhyay *et al.*, 2012); mientras que los IBs clásicos se forman con temperaturas (40-42 °C) de cultivo más altas y tienen la característica de ser agregados más densos y resistentes a las proteasas (Margreiter *et al.*, 2008). Retomando el péptido A β 42 como ejemplo, los IBs formados a 18 °C tuvieron 16 veces mayor actividad que los formados a 42 °C (de Groot & Ventura, 2006).

La percepción de que los IBs contienen proteínas inactivas y sin posibilidades de replegamiento fisiológico dentro de la célula bacteriana ha sido común durante mucho tiempo. No obstante, los avances en las investigaciones han demostrado que tienen diferentes conformaciones, incluidas estructuras activas y ricas en β -lámina (Choi *et al.*, 2014; Prasad *et al.*, 2011; Rinas *et al.*, 2017; Upadhyay *et al.*, 2012). Esto se demostró primero con las estructuras amiloides, mediante técnicas de espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de dicroísmo circular (CD) y difracción de rayos X de baja resolución (Rinas *et al.*, 2017). La actividad biológica de los IBs ha permitido explorar aplicaciones directas, es decir, después su aislamiento o seguir una serie de pasos que permite obtener proteínas con características similares a sus versiones nativas para diferentes fines incluidos los análisis estructurales. Un ejemplo de aplicación directa incluye su uso como acarreadores al interior de las células; son capaces de tener penetrabilidad espontánea en células de mamíferos lo que ha permitido adaptarlos como materiales nanoestructurados para la decoración de superficies en ingeniería de tejidos, con aplicaciones potenciales en biomedicina y ciencias de los materiales, por lo que se les puede considerar un biomaterial (Rinas *et al.*, 2017).

Por otro lado, el aislamiento de proteínas activas y con características estructurales similares a la versión nativa a partir de IBs es un proceso que requiere de al menos tres pasos; aislamiento, solubilización y replegamiento. En la literatura están disponibles una amplia gama de protocolos para la purificación de IBs, todos ellos incluyen lisis celular y pasos de lavado. La lisis celular se logra utilizando métodos mecánicos o no mecánicos, o una combinación de ambos, mientras que los pasos de lavado incluyen, entre otros, tratamientos con detergentes (Triton X-100 (0.1–4 % (v/v), sarkosyl) y/o ADNasa (Rodríguez-Carmona *et al.*, 2010), algunos otros incluyen el uso de bajas concentraciones de desnaturalizantes como la urea, ya que eliminan los contaminantes hidrofóbicos adsorbidos en los

IBs (Kaur *et al.*, 2018). Un buen protocolo debe permitir recuperar cantidades elevadas de IBs puros que suelen representar entre el 90 y el 95 % del total de proteínas agregada (Upadhyay *et al.*, 2012), ya que, la calidad y la composición de los IBs afectan el rendimiento de replegamiento y la posterior purificación de la proteína recombinante (Krachmarova *et al.*, 2020).

El paso de solubilización de los IBs es relativamente fácil y se realiza agregando un desnaturalizante, comúnmente, se usan los agentes caotrópicos como la urea y/o cloruro de guanidinio (GuHCl) o el tiocianato de guanidinio (GuSCN). Por lo general los IBs pequeños son blandos y son solubles en una concentración baja del caotrópico, mientras que, los cuerpos de inclusión de tamaño grande son más densos y requieren una concentración molar alta de caotrópico (8 M de urea o 6 M de GuHCl) para una solubilización completa. Otras alternativas de solubilización incluyen detergentes como SDS, sarkosyl y un pH alcalino. La reducción de los enlaces disulfuro presentes en la proteína generalmente se logra con β -mercaptoetanol o DTT (5-100 mM). Los agentes quelantes como el EDTA se utilizan para la quelación de iones metálicos e inhibir reacciones de oxidación no deseadas. Las proteínas de los IBs pueden poseer una estructura secundaria similar a la nativa y es útil en el replegamiento de la proteína a su forma activa. La solubilización con disolventes suaves restaura la estructura secundaria similar a la nativa, lo que mejora la recuperación de la proteína bioactiva en comparación con la solubilización con una alta concentración de agente caotrópico (Kaur *et al.*, 2018). En la siguiente sección abordaremos los métodos de replegamiento empleados en este trabajo.

1.4.3. Técnicas de replegamiento *in vitro*

El replegamiento de la proteína solubilizada a la forma activa es un paso muy crítico ya que la muestra se agrega durante este proceso. Para llevar a la proteína solubilizada a su conformación nativa es necesario eliminar gradualmente el desnaturalizante. Para maximizar el rendimiento del replegamiento se requiere la optimización de las condiciones experimentales, sin embargo, los protocolos difieren de una proteína a otra. Primero se debe de considerar el protocolo de replegamiento, a la fecha se han informado numerosos procedimientos, los más comunes son la dilución y diálisis de la proteína en un *buffer* de replegamiento (Kato & Ohashi, 2021; Wingfield *et al.*, 1995). Pero también es posible realizar el replegamiento en columnas

cromatográficas preempacadas las cuales ofrecen ciertas ventajas sobre los métodos más utilizados (Wingfield *et al.*, 1995).

El replegamiento por dilución puede ser rápido o lento. En una dilución rápida, la concentración de proteína y desnaturizante disminuye drásticamente a medida que la proteína solubilizada se incorpora al *buffer* de replegamiento, pero puede ser perjudicial para las proteínas que necesitan más tiempo para replegarse al estado nativo. Por lo tanto, la dilución lenta es el método alternativo, ya que es un proceso más suave (Kaur *et al.*, 2018). En el método de diálisis, la proteína desnaturizada concentrada se dializa frente a un *buffer* de replegamiento, lamentablemente es común que ocurra la agregación con más frecuencia que con otros métodos (Kaur *et al.*, 2018).

El replegado en columnas cromatográficas preempacadas es una alternativa donde otros métodos fallan. El uso de columnas incluye las columnas de afinidad y columnas de filtración en gel. En las columnas de afinidad la proteína inmovilizada puede replegarse disminuyendo la concentración de desnaturizante a la velocidad deseada y luego eluir la proteína. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) tiene la ventaja de separar la forma plegada de las formas agregadas y mal plegadas durante la elución (Prasad *et al.*, 2011), particularmente en el volumen vacío, pero es importante aplicar pasos previos de purificación (Kwon *et al.*, 2019). Varias proteínas han sido exitosamente purificadas y replegadas con este método (de la Cruz *et al.*, 2019; Gu *et al.*, 2001, 2004; Lartey *et al.*, 2021; Núñez-Muñoz *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2015).

Un aspecto importante que se debe de considerar es el *buffer* de replegamiento, desafortunadamente no es universal, ya que cada proteína tiene características fisicoquímicas que la distinguen de las demás. Por lo tanto, es necesario examinar las condiciones de replegamiento de cada proteína. Los aditivos son un componente que ayuda a estabilizar en estado nativo de la proteína, ayuda en la cinética de plegamiento y suprime la agregación no específica. Los aditivos incluidos en los *buffers* de replegamiento más utilizados son la L-arginina, la urea en baja concentración o el GuHCl y los detergentes (Kaur *et al.*, 2018). La L-arginina mejora la eficiencia de replegamiento de las proteínas de los IBs al suprimir la agregación de los intermediarios de plegamiento. Además, el grupo guanidino de la arginina interactúa con los residuos de triptófano para reducir la agregación de proteínas. Aunque la arginina afecta débilmente la estructura local de los residuos circundantes de triptófano y tirosina; no es un desnaturizante de proteínas ya que difiere en el modo de acción del clorhidrato de guanidina o urea. Estos aditivos se eliminan fácilmente del *buffer* de replegamiento,

pero los detergentes necesitan un tratamiento especial para su eliminación después del replegamiento de proteínas (Kaur *et al.*, 2018).

El pH es una de las variables que puede tener un papel importante, dado que la pI no debe usarse para experimentos de replegamiento para evitar la precipitación. La temperatura es otra variable que tiene un efecto sobre la estabilidad y movilidad de los intermedios de replegamiento. Es importante considerar la concentración de proteínas ya que determina el grado de aglomeración y, por lo tanto, la frecuencia de las colisiones moleculares entre las moléculas desplegadas y los intermediarios de plegamiento, que pueden promover la agregación. Dado que la tasa de agregación es mayor que la tasa de plegamiento a una concentración inicial alta de proteínas es recomendable utilizar concentraciones de proteína de 10 a 15 $\mu\text{g/ml}$ durante el replegamiento. La eficiencia del proceso de replegamiento es mayor si la concentración de proteína final es menor durante el replegamiento. Otro componente imprescindible para incluir en el *buffer* de replegamiento es un sistema redox para la renaturalización de proteínas con enlaces disulfuro nativos. La combinación de formas reducidas y oxidadas de agentes redox se utilizan en proporciones molares de 1:1 a 10:1, por ejemplo, glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG), DTT/GSSG, cisteína/cistina (Kaur *et al.*, 2018).

1.5. La Na^+ , K^+ -ATPasa

La Na^+ , K^+ -ATPasa, también llamada Na^+/K^+ -adenosintrifosfatasa, bomba de sodio o NKA es miembro de la familia P-ATPasas dentro de la subfamilia P2-ATPasas. La NKA es una proteína hetero-oligomérica que se encuentra en la membrana plasmática de todas las células animales (Lacidogna *et al.*, 2017). Su función fue descrita por Skou en 1957 (Jørgensen, 1986; Silva *et al.*, 2021; Skou, 1957). Esta familia también incluye a la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico, la H^+ , K^+ -ATPasa gástrica, las bombas de metales pesados y las flipasas lipídicas (Axelsen & Palmgren, 2001; Käthi Geering, 2001). Las P-ATPasas se caracterizan por formar un intermediario fosforilado durante el proceso catalítico, es por ello el nombre de tipo P, además, son inhibidas por vanadato, y por tener varios motivos de secuencia en común entre los miembros (Axelsen & Palmgren, 2001). La bomba de sodio suele estar formada por las subunidades α y β , pero en algunos tejidos las células producen adicionalmente a la subunidad γ . La subunidad α es la

catalítica, tiene un peso molecular de aproximadamente 110 kDa y los sitios de unión de Mg^{2+} , ATP, Na^+ , K^+ y esteroides cardiotónicos (Kaplan, 2002; Lobato-Álvarez et al., 2016; Silva et al., 2021), se conocen cuatro isoformas (α_1 , α_2 , α_3 y α_4). La subunidad β es una glicoproteína que se compone de alrededor de 310 aminoácidos y que está involucrada en la maduración estructural y funcional de la bomba de sodio (Kaplan, 2002), existen tres isoformas (β_1 , β_2 y β_3). Finalmente, la subunidad γ (FXD2) pertenece a la familia FXD, que es una familia de pequeñas proteínas reguladoras, compuestas por un segmento transmembrana, un extremo extracelular N-terminal y un extremo citoplásmico C-terminal. Reciben su nombre de la secuencia FXD conservada en el dominio extracelular, se dispone de siete miembros homólogos (FXD1-7). FXD2 se encarga de modular la afinidad de la NKA por diferentes ligandos, siendo considerada, de esta forma, reguladora como la subunidad β (Kaethi Geering, 2008; Lacidogna et al., 2017; Mishra et al., 2011). La alteración en la expresión y función de las diferentes subunidades de la NKA está asociada con algunas condiciones patológicas, como la diabetes, hipertensión, los trastornos cardiovasculares y renales, la artritis reumatoide, la sepsis, los trastornos neurológicos, la eliminación del edema pulmonar, la preeclampsia y el cáncer (Bejcek et al., 2021; Silva et al., 2021).

La Na^+ , K^+ -ATPasa transporta tres iones Na^+ del interior al exterior de la célula acoplados a la autofosforilación a partir de ATP, y dos iones K^+ del exterior al interior acoplados a la autofosforilación. Este proceso ocurre en un ciclo de reacción en el cual se distinguen dos conformaciones: E_1 , con alta afinidad por Na^+ , y E_2 , con alta afinidad por K^+ (para mayor detalle consultar el **Anexo 1**). Las estructuras cristalinas de la Na^+ , K^+ -ATPasa se han obtenido a partir del riñón de cerdo y de las glándulas rectales de tiburón, y han contribuido a la comprensión de la función y la estructura tridimensional de esta bomba. Se han reportado estructuras cristalinas de la NKA en estado E_2 ($E_2 \cdot 2K^{2+} \cdot Pi$) de las glándulas rectales de tiburón, tanto con y sin ouabaína unida, con resoluciones de 2.8 Å y 2.4 Å, respectivamente (Ogawa et al., 2009; Shinoda et al., 2009). También se ha informado sobre la estructura de la NKA en estado E_2 de riñón de cerdo, con una resolución de 3.5 Å (Morth et al., 2007b). Además, las estructuras de la NKA de riñón de cerdo a una resolución de 2.8 Å han proporcionado información sobre el estado de transición $E_1P \cdot ADP \cdot Na^+$, que precede a $E_1P \cdot 3Na^+$ (Kanai et al., 2013). Cabe destacar que la secuencia de la NKA de riñón de cerdo presenta un 92 % de identidad con la NKA de riñón de perro (Páez et al., 2019). Las estructuras mencionadas aquí son las de mayor resolución y se han obtenido utilizando la técnica de cristalografía de rayos X. Recientemente, se han reportado las estructuras de la NKA de las glándulas rectales de

tiburón utilizando Cryo-EM (Kanai *et al.*, 2022) en dos estados E₂P, que muestran modos de unión diferentes a los previamente informados para los esteroides cardiotónicos. Estos estados se estabilizan mediante ATP y fosfato inorgánico (Pi), y se han estudiado tanto con y sin ouabaína o istaroxima. La resolución más alta obtenida fue de 3.0 Å en el estado E₂PPi·Mg²⁺ (unido a ouabaína) (Kanai *et al.*, 2022). En la **Figura 6** se presentan los modelos de cintas de la NKA de las glándulas rectales de tiburón (código PDB: 2ZXE) y de riñón de cerdo (código PDB: 3WGU), obtenidos mediante cristalografía de rayos X, así como, el modelo obtenido por Cryo-EM de las glándulas rectales de tiburón (código PDB: 7WY). De acuerdo con lo informado por Shinoda *et al.* (**Figura 6A**) se sabe que la proteína completa tiene un tamaño de 15-16 nm (Shinoda *et al.*, 2009).

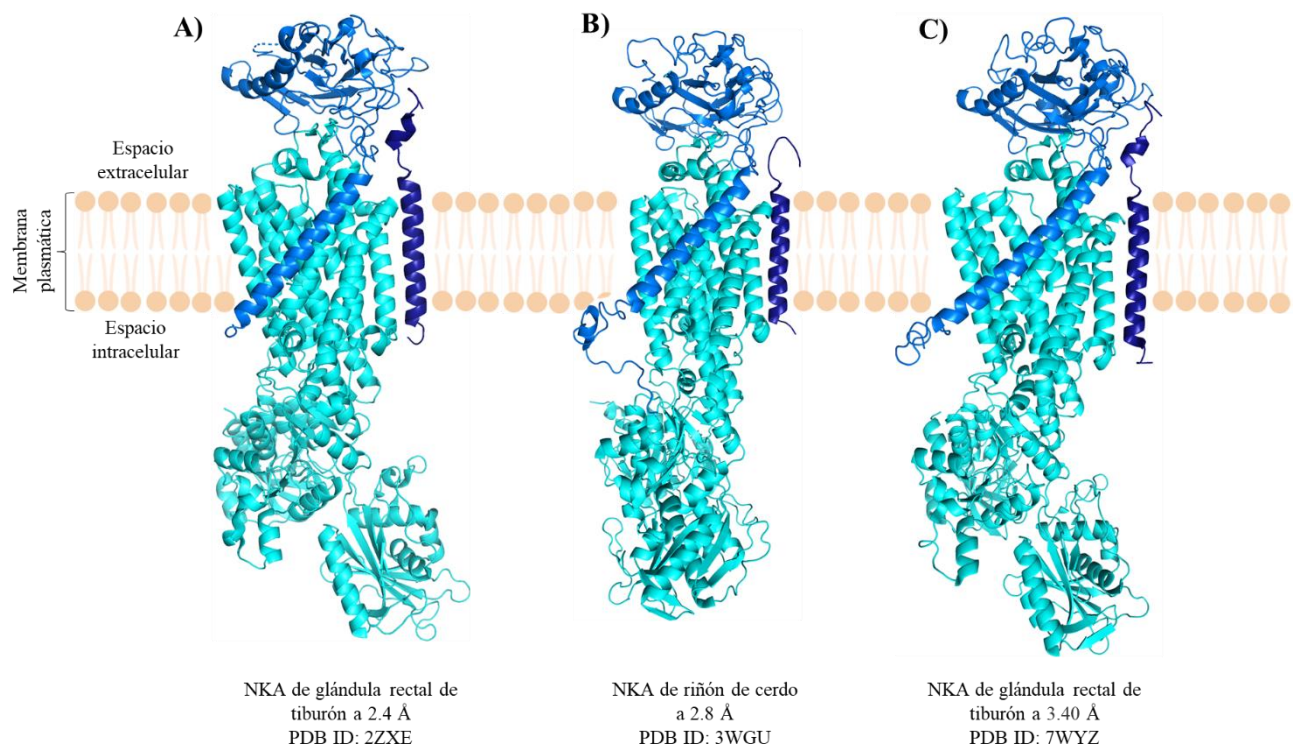


Figura 6. Modelos en cinta de la NKA. A) y B) son las estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X. C) modelo en cintas obtenido por Cryo-EM. En todos los casos el color cian corresponde a la subunidad α_1 , en azul marino se asignó a la subunidad β_1 y el azul denso indica a la subunidad γ .

1.5.1. La Na⁺, K⁺-ATPasa de las células epiteliales

En los tejidos epiteliales, las células están conectadas entre sí mediante uniones celulares que pueden ser: estrechas (TJs, *tight junctions*), adherentes (AJs, *adherent junctions*) y comunicantes (GJs, *gap junctions*) (Lobato-Álvarez *et al.*, 2016). Las TJs y las AJs unen las células individualmente para restringir la difusión a través del epitelio, proporcionan importantes contactos adhesivos entre células vecinas (Hartsock & Nelson, 2008). Las uniones estrechas dividen la membrana plasmática en un dominio apical y uno basolateral, además, controlan el paso paracelular de iones y solutos entre células (Campbell *et al.*, 2017; Hartsock & Nelson, 2008). Las GJs comunican los espacios intercelulares y se ubican basalmente. Las uniones adherentes median la adhesión célula-célula a través de las regiones extracelulares de las proteínas nectinas y cadherinas (Campbell *et al.*, 2017). La NKA se transporta desde la red trans-Golgi al dominio lateral de las células epiteliales (Caplan *et al.*, 1986; Cereijido *et al.*, 1980; Contreras *et al.*, 1995; Mays *et al.*, 1995), se localiza en las AJs y desempeña un papel en el mantenimiento de estas uniones junto con la E-cadherina (Rajasekaran *et al.*, 2001). Varios estudios han demostrado que esta función de la NKA está mediada por la subunidad β_1 , de la cual se hablará a continuación.

1.6. La subunidad β_1 de la NKA

Las subunidades β son proteínas de membrana tipo II, tienen un segmento transmembrana, un dominio citoplasmático N-terminal y un gran dominio globular extracelular o ectodominio (ED) C-terminal que contiene seis residuos de cisteína extracelulares que forman tres puentes disulfuro que son completamente conservados entre las isoformas (Käthi Geering, 2001; Kanai *et al.*, 2013). Para el caso de *Canis lupus familiaris* (perro) se ubican en la Cys126-Cys149, Cys159-Cys175 y Cys213-Cys276. La subunidad β tiene una masa molecular aparente de 55 kDa debido a que entre las isoformas hay diferentes grados de N-glicosilación. Particularmente, la isoforma β_1 de la NKA del riñón de perro tiene tres sitios de N-glicosilación, estos se ubican en la Asn158, Asn193 y Asn265. La subunidad β_1 de la NKA de riñón de perro y de cordero tiene glicanos con el extremo terminal sialilado (Treuheit *et al.*, 1993). El modelo atómico de la NKA de tiburón reportado recientemente por Cryo-EM (Kanai *et al.*, 2013) reveló que las estructuras de los glicanos que sobresalen de la subunidad β_1 están formados por cadenas de cuatro azúcares en los cuatro residuos de Asn (Asn114,

Asn159, Asn194 y Asn267 de la secuencia de aminoácidos para tiburones), en dos de ellos, la cadena de azúcar está ramificada en el segundo residuo, lo que indica que está fucosilado. La cadena de azúcar en la Asn114 es específica para la bomba de sodio de tiburón (Kanai *et al.*, 2022). Del modelo anterior de riñón de cerdo obtenido por cristalografía de rayos X (Kanai *et al.*, 2013) también se identificaron dos cadenas de azúcares en los residuos Asn158 y Asn265 (numeración de la secuencia para cerdo), sin embargo, se aprecian mejor en los modelos obtenidos por Cryo-EM (Kanai *et al.*, 2022). El modelo de la NKA reportado por Shinoda *et al.* (2009) reveló que el dominio extracelular de la subunidad β_1 contiene un motivo bien conservado YYPYY que media varios puentes salinos con el bucle L7/8 de la subunidad α (Shinoda *et al.*, 2009).

Las funciones biológicas de la subunidad β_1 incluyen el plegamiento, tráfico e inserción adecuada de NKA en la membrana plasmática. Además, es una chaperona, le confiere estabilidad y modula la afinidad de unión de cationes de la subunidad α (Käthi Geering, 2001; Lobato-Álvarez *et al.*, 2016). Asimismo, la subunidad β_1 es una molécula de adhesión celular (CAM, por sus siglas en inglés). Las CAMs son proteínas transmembrana responsables de la matriz celular o reconocimiento célula-célula. En las células epiteliales la adhesión intercelular es por la vía CAMs (Campbell *et al.*, 2017; Cerejido *et al.*, 2016). La estructura secundaria tipo β sándwich del ED β_1 junto con las N-glicosilaciones son características de las CAMs en las uniones célula-célula (Páez *et al.*, 2019). De manera similar, la isoforma β_2 (AMOG) expresada en los astrocitos se identificó originalmente como una molécula de adhesión en las células gliales (Gloor *et al.*, 1990). Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que la subunidad β_2 expresada en células epiteliales (células de riñón canino de Madin-Darby, MDCK) o en fibroblastos (células derivadas de ovario de hámster chino, CHO) es una molécula de adhesión homotípica (Roldán *et al.*, 2022). Un aspecto interesante es que las CAMs suelen tener dominios extracelulares repetidos, en cambio, el dominio extracelular de las subunidades β_1 y β_2 de la NKA consta de un solo dominio globular (Páez *et al.*, 2019).

Particularmente, en las células MDCK, al igual que en la mayoría de los epitelios, la NKA está compuesta por las subunidades $\alpha_1\beta_1\gamma$ y se polariza hacia el dominio lateral en los contactos célula-célula (Cerejido *et al.*, 2001; Shoshani *et al.*, 2005) (**Figura 7A**). La subunidad β_1 de la Na⁺, K⁺-ATPasa se localiza con las proteínas de unión adherente desde la formación de contactos celulares (Vagin *et al.*, 2006). Además, la expresión de la bomba de sodio en el borde lateral solo se

observa cuando ambas células vecinas son homotípicas, es decir, reconocen a otra NKA de la misma especie en la célula adyacente a través de la subunidad β_1 (Padilla-Benavides *et al.*, 2010; Shoshani *et al.*, 2005) (**Figura 7C, D y E**). Cuando la subunidad β_1 de MDCK se expresa en células no polarizados (CHO), estas se vuelven adhesivos y se observa a la NKA en los bordes de contacto célula-célula (**Figura 7B, D, E y F**) (Shoshani *et al.*, 2005). Los trabajos de nuestro laboratorio han demostrado que la localización lateral de la Na^+ , K^+ -ATPasa en las células MDCK depende del reconocimiento y la adhesión entre las subunidades β_1 de las células vecinas (Padilla-Benavides *et al.*, 2010; Shoshani *et al.*, 2005). La **Figura 7** corresponde a las imágenes de inmunofluorescencia que ilustran estas observaciones.

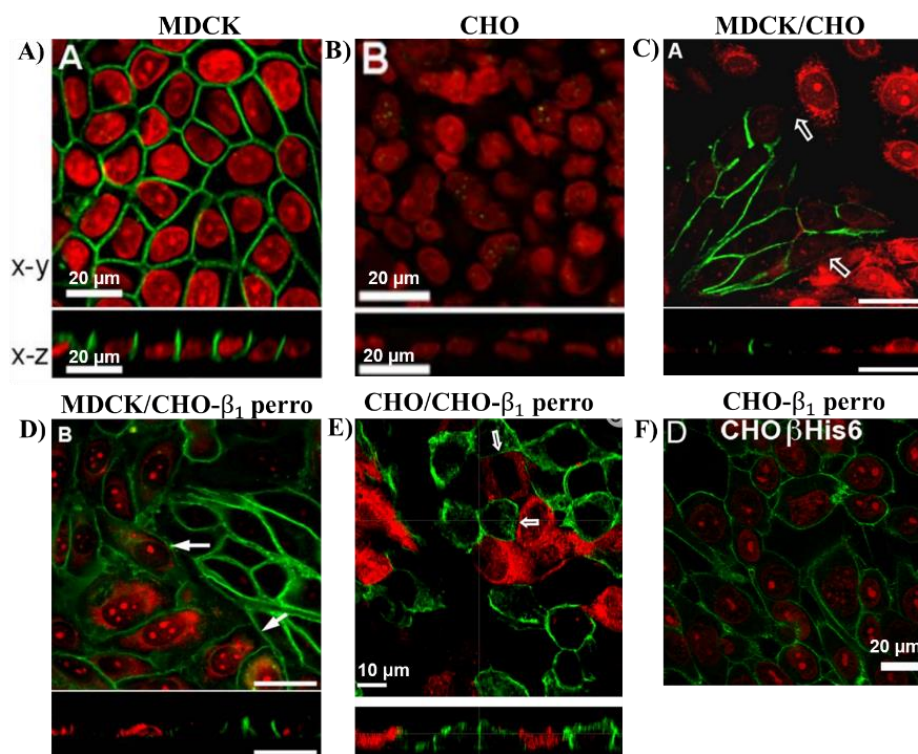


Figura 7. Imágenes confocales de inmunofluorescencia de la localización de la NKA en la membrana lateral en células epiteliales. A) monocapa de células MDCK (núcleos teñidos en rojo con yoduro de propidio) que muestra que la subunidad β_1 solo se expresa en las en el dominio lateral (en verde, panel superior x-y e inferior x-z) donde las células se ponen en contacto entre sí (Shoshani *et al.*, 2005). B) la detección de la subunidad β_1 en monocapa de células CHO (núcleos en rojo) no muestra a la NKA de perro (Shoshani *et al.*, 2005). C) co-cultivos en donde las células MDCK solo expresan a la NKA en los bordes homotípicos de MDCK/MDCK (en verde), pero no en los que están en contacto con las células CHO (núcleos en rojo), tal como se indica con las flechas de borde blanco (Shoshani *et al.*, 2005). D) células MDCK co-cultivada con CHO transfectada con la subunidad β_1 de MDCK (CHO- β_1); la subunidad β_1 se detecta en los contactos tanto homotípicos como heterotípicos (flechas blancas) (Shoshani *et al.*, 2005). E) co-cultivos de

CHO/CHO- β_1 , las células CHO- β_1 expresan a la subunidad β_1 de perro en la membrana en los contactos heterotípicos (flecha de borde blanco) y homotípicos (Shoshani et al., 2005). F) células CHO que expresan a la subunidad β_1 de MDCK en sus membranas plasmáticas laterales (verde) (Padilla-Benavidez et al., 2015).

La interacción directa en *trans* de la subunidad β_1 (β_1 - β_1) en el epitelio ha sido confirmada por estudios de mutagénesis dirigida al sitio, co-inmunoprecipitación y transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (Padilla-Benavides et al., 2010; Tokhtaeva et al., 2011). Varios estudios han sugerido que esta interacción β_1 - β_1 ocurre a nivel molecular. Con el fin de identificar la interfaz de interacción, el grupo de Vagin et al. estudió la región variable entre la subunidad de perro y de rata, ya que, a pesar de su alta homología mostraron muy baja adhesión. Ellos demostraron que la secuencia de 197-208 aminoácidos en el dominio extracelular de la subunidad β_1 que está expuesta hacia una célula vecina está involucrada tanto en la interacción β_1 - β_1 como en la adhesión intercelular (Tokhtaeva et al., 2012). Mediante mutagénesis dirigida al sitio identificaron cuatro residuos conservados (Leu196, Glu197, Tyr199 y Tyr205) en la secuencia de aminoácidos 197-208 de la subunidad β_1 que son responsables de la especificidad de la interacción entre las subunidades β_1 de la misma especie (Tokhtaeva et al., 2016). Posteriormente, en nuestro laboratorio se demostró mediante análisis *in silico* y mutagénesis que además de ese dominio de especificidad a la especie, existe al menos un dominio más de interacción que se extiende entre los residuos 221-229 (Páez et al., 2019). En este trabajo, se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular (MD) y acoplamiento proteína-proteína del dominio extracelular (residuos de aminoácidos 61 al 303) de la subunidad β_1 de la Na⁺, K⁺-ATPasa de riñón de perro. El modelo del ED β_1 fue construido por homología, ya que la NKA de perro tiene un 92 % identidad con la secuencia de la NKA de cerdo, se consideró la estructura cristalina con código PDB 3WGU la cual tiene una resolución del 2.8 Å. El modelo de dímeros de interacción (β_1 - β_1) reportado se muestra en la **Figura 8** y se propone que la asociación *trans* es a través de los residuos 198-207 y 221-229, en este modelo no se consideran las N-glicosilaciones (Páez et al., 2019). Los análisis de mutagénesis mostraron que es más probable que los residuos 222-224 y 227-229 estén más implicados en la asociación entre las subunidades β_1 . Los residuos 231-233 también podrían desempeñar un papel en el reconocimiento entre las subunidades β_1 , aunque en menor medida (Páez et al., 2019). Las regiones glicosiladas unidas a la subunidad β_1 se ha reportado que tienen un rol en la adhesión célula-célula, ya que en células MDCK que expresan a la subunidad β_1 no glicosilada forman los contactos célula-célula más lentamente en contraste con las células

MDCK con la subunidad β_1 silvestre (Vagin *et al.*, 2006). Vagin *et al.* (2008) reportaron que la reducción de la ramificación de N-glicanos en la subunidad β_1 acerca y estabiliza las uniones célula-célula. Pero la eliminación mutagénica de los sitios de N-glicosilación deteriora la adhesión célula-célula (Vagin *et al.*, 2008). Las interacciones β_1 - β_1 forman la adhesión intercelular y su debilitamiento puede contribuir a la migración y la metástasis (Lubarski-Gotliv *et al.*, 2017). Los glucocorticoides (triamcinolona, dexametasona y fluorometolona) utilizados como agentes clínicos en numerosos cánceres pueden inducir una expresión elevada de la subunidad β_1 lo que conduce a una mayor adhesión célula-célula, reducen la motilidad, la invasión, dando como resultado la atenuación en la progresión tumoral en el carcinoma de células renales (Huynh *et al.*, 2015).

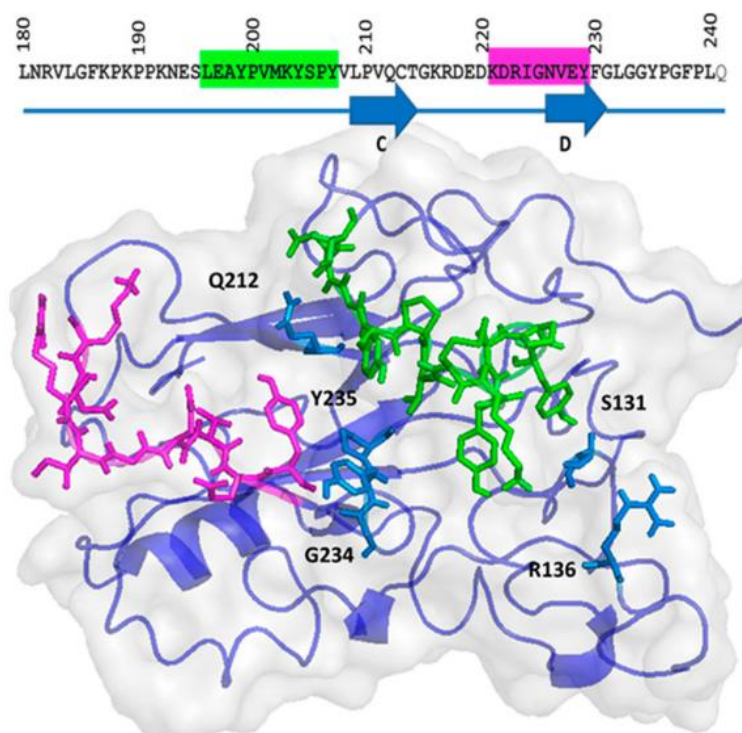


Figura 8. Modelo de la predicción de la interfaz de interacción β_1 - β_1 , los dos segmentos que forman la interfaz están marcados en la secuencia de la subunidad β_1 en color verde y magenta. Los Residuos de interfaz están resaltados en representación de palos (Páez *et al.*, 2019).

1.7. Técnicas de caracterización en la N&N

En la actualidad se tienen disponibles varias técnicas para ver, medir y manipular la materia a escala nanométrica. En el estudio de las proteínas estas técnicas son aplicadas. La caracterización de

las proteínas purificadas a partir de IBs es un paso fundamental para garantizar la estructura y funcionalidad adecuada de las proteínas obtenidas después de replegarse. El análisis de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas es un enfoque complementario valioso en el control de calidad para validar el plegamiento *in vitro* de proteínas. A continuación, se mencionan las tres técnicas empleadas para caracterizar a la subunidad β_1 replegada desde IBs en este trabajo.

1.7.1. Dispersión de luz dinámica

La dispersión de luz dinámica (DLS, *Dynamic light Scattering*) mide las fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad de la luz dispersa que ocurren debido a que las partículas, moléculas o agregados experimentan un movimiento browniano (Jachimska *et al.*, 2008), el cual se define como: “el movimiento aleatorio de partículas en un líquido debido al bombardeo de las moléculas que las rodean”. Una característica de este movimiento es que las partículas pequeñas se mueven más rápido que las grandes. Por tanto, las fluctuaciones de intensidad de luz dispersada registradas durante un análisis DLS contiene información sobre la escala de tiempo del movimiento de los dispersores (Lorber *et al.*, 2012). La DLS es particularmente adecuada para estudios de plegamiento y agregación de proteínas recombinantes, ya que la formación de agregados proteicos se puede dar durante su producción debido a diversos factores físicos y químicos, por ejemplo, fluctuación de temperatura, variación del pH, oxidación, agitación, etc.

1.7.2. Espectroscopia Raman

El análisis de proteínas por espectroscopia Raman se centra comúnmente en la estructura secundaria, especialmente por la sensibilidad de los ángulos diedros ϕ y ψ del esqueleto polipeptídico y la fuerza del enlace hidrógeno entre los grupos C=O y N-H (Kuhar *et al.*, 2021). Los espectros obtenidos proporcionan firmas únicas de estructuras como α -hélices, β -lamina, giros, estructuras aleatorias, entre otras (Dolui *et al.*, 2020; Kuhar *et al.*, 2021; Kurouski *et al.*, 2015). Por lo tanto, un espectro Raman de una proteína se compone de contribuciones de tres tipos principales de modos vibracionales, los que se originan en la cadena polipeptídica principal (banda de la amida), las de cadenas laterales de residuos de aminoácidos aromáticos y no aromáticos (Kurouski *et al.*, 2015).

La señal de los aminoácidos no aromáticos en la espectrometría Raman suele ser muy débil debido a la baja polarización de las cadenas laterales alifáticas; sin embargo, la contribución de las cadenas laterales no aromáticas al espectro Raman de una proteína puede ser significativa debido a su abundancia relativa en la estructura de la proteína. Las bandas Raman de estas cadenas laterales se distribuyen a lo largo del intervalo espectral de 500-1700 cm^{-1} y a menudo interfieren con otros marcadores estructurales en el espectro, particularmente con la banda ancha de la amida III dentro del intervalo de 1200-1400 cm^{-1} . Las bandas son sensibles a las estructuras proteicas secundarias y de orden superior y, en general, difieren entre proteínas nativas y polipéptidos sintéticos o aminoácidos individuales (Nemecek *et al.*, 2013).

1.7.3. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (CD) se basa en la diferencia de absorción que se produce en las moléculas con quiralidad (grupos absorbentes de luz) cuando se excitan con luz polarizada circularmente hacia la izquierda o hacia la derecha (Campos, 2022; Gomes & Faísca, 2019). En las proteínas, el esqueleto peptídico se compone de centros quirales que muestran señales características de UV-lejano (190-250 nm) y controlan la conformación de la estructura secundaria en la proteína (Campos, 2022). Además, los residuos aromáticos (Trp (300-280 nm), Tyr (290-270 nm) y Phe (270-250 nm)) se orientan quiralmente cuando el resto de la estructura de la proteína restringe la movilidad de su cadena lateral, mostrando un espectro de CD característico en la región del UV-cercano (250-300 nm) con intensidades más bajas que se pueden sumar al espectro de UV-cercano correspondiente a la estructura secundaria (Campos, 2022; Gomes & Faísca, 2019). Idealmente las proteínas que son en su mayoría α -helicoidales tienen espectros intensos con una banda positiva a 190 nm y dos caídas con mínimos en alrededor de 208 y 222 nm. Las proteínas con una estructura regular de β -hoja (Tipo β -I: con cadenas largas y alineadas) exhiben bandas menos intensas con un máximo a 190 nm. Las proteínas con estructura aleatoria y de Tipo β -II (proteínas ricas en estructura β que contienen solo cadenas cortas que no están alineadas) exhiben un espectro de CD similar, con una banda negativa a 200 nm y casi ninguna banda positiva, en la **Figura 9** se muestra un espectro de CD ilustrando del comportamiento de las principales estructuras secundarias.

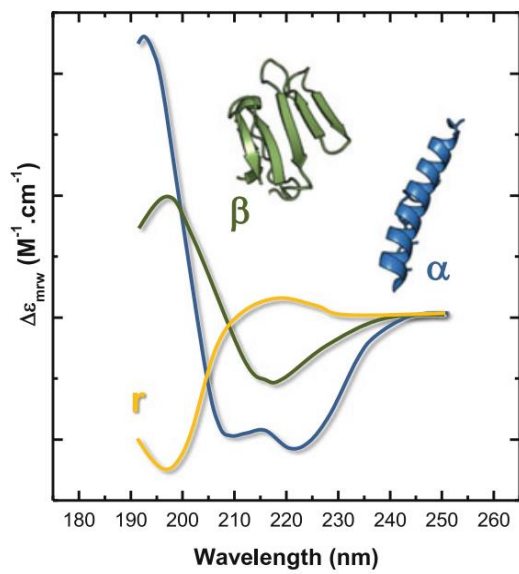


Figura 9. Espectros característicos de CD de estructuras secundarias en proteínas (Gomes & Faísca, 2019).

CAPITULO II. JUSTIFICACIÓN

La subunidad β_1 de la Na^+ , K^+ -ATPasa de perro es una proteína de adhesión celular homotípica en el epitelio. La base estructural de la interacción β_1 - β_1 en *trans* solo se ha descrito por simulaciones de dinámica y acoplamiento molecular, y se ha propuesto que la asociación es a través de los residuos 198-207 y 221-229. Sin embargo, es necesario conocer la interfaz de interacción de forma experimental. A la fecha, están disponibles en el PDB varias estructuras de rayos X (Kanai *et al.*, 2013, 2022; Laursen *et al.*, 2013; Morth *et al.*, 2007a; Toyoshima *et al.*, 2011) y Cryo-EM (Kanai *et al.*, 2022) de la NKA de cerdo y de tiburón de alta resolución. A pesar de esto no es posible observar dímeros β_1 - β_1 en estos modelos. Estudios previos de nuestro laboratorio indican que el dominio extracelular ($\text{ED}\beta_1$) de la subunidad β_1 es una estructura estable que permanece plegada independientemente del resto de la NKA. Además, de demostrar que la versión soluble del $\text{ED}\beta_1$ recombinante de células animales tiene propiedades adhesivas. Por lo tanto, es posible estudiar la formación de dímeros β_1 - β_1 . En este contexto, la producción recombinante de proteínas de membrana en *E. coli* puede conducir a la formación de cuerpos de inclusión. Se han reportado varios protocolos para la recuperación de proteínas desde cuerpos de inclusión con características biológicas y estructurales similares a sus versiones nativas; por lo que la recuperación del $\text{ED}\beta_1$ desde IBs y el uso de técnicas aplicadas para el estudio a nanoescala puede ser una alternativa para la obtención de proteína pura y estable que permitan la formación de dímeros para su posterior análisis a resolución atómica y de esta forma corroborar la interfaz de interacción propuesta.

CAPITULO III. HIPÓTESIS

Para conocer el mecanismo de adhesión celular de la subunidad β_1 de la NKA en las células epiteliales, los dominios extracelulares de la subunidad β_1 recuperados desde cuerpos de inclusión formarán dímeros en solución que sirven para estudios a resolución atómica.

CAPITULO IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Producir al dominio extracelular de la subunidad β_1 recombinante de la Na^+ , K^+ -ATPasa con características estructurales y biológicas análogas a su versión nativa que permita conocer la interfaz de interacción β_1 - β_1 .

4.1.1. Objetivos específicos

1. Expresar al ED β_1 de la Na^+ , K^+ -ATPasa empleando *Escherichia coli* SoluBL21 y Rosetta (DE3) como sistema de expresión.
2. Establecer un protocolo de purificación para el ED β_1 empleando técnicas cromatográficas con la finalidad de obtenerlo en alta pureza y concentración.
3. Evaluar mediante técnicas de caracterización y ensayos de interacción β_1 - β_1 al ED β_1 recombinante para conocer si su estructura y función son análogas a la versión nativa.

CAPÍTULO V. METODOLOGÍA

La estrategia experimental desarrollada en este proyecto se dividió en cuatro etapas. En la **Figura 10** se muestra el esquema general, en la etapa 1 se obtuvieron los diferentes vectores de expresión para el ED β ₁. La etapa 2 se centró en establecer la estrategia de purificación del ED β ₁ recombinante para obtenerlo en alta concentración, de forma soluble y estable. En la etapa 3 se caracterizó el radio hidrodinámico (r_H) y la estructura secundaria de la proteína purificada mediante análisis de difracción láser de luz y espectroscopia Raman. Por último, con la finalidad de demostrar que el ED β ₁ obtenido tenía una función biológica análoga a la proteína nativa de las células epiteliales del riñón de perro, en la etapa 4 se enfocó en realizar ensayos de interacción β_1 - β_1 .

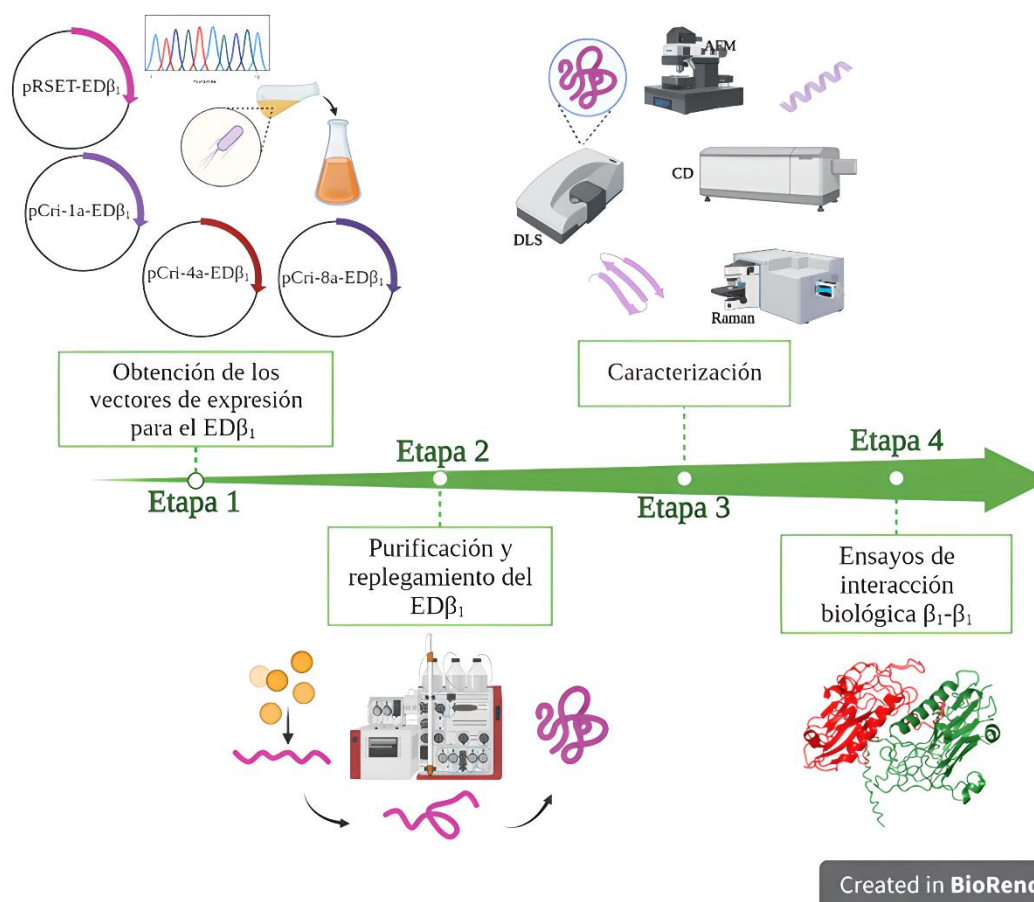


Figura 10. Esquema general de la estrategia experimental.

5.1. Etapa 1: Obtención de los vectores de expresión

La secuencia que codifica para la subunidad β_1 completa de la NKA de *Canis lupus* con codones optimizados para *E. coli* se adquirió comercialmente dentro del vector pUC57 (pUC57- β_1). La optimización de codones fue realizada por la empresa GenScrip empleando el algoritmo OptimumGeneTM. La secuencia de aminoácidos de referencia que se proporcionó se consultó en la base de datos *UniProt* (código ID: P06583) y en la base de datos del *Nacional Center for Biotechnology Information* (código *NCBI*: NP_001003283.2) (**Figura 11**). El vector pUC57- β_1 se reconstituyó en agua desionizada y estéril, en seguida se procedió a transformar células químicamente competentes *E. coli* Top10 (DH5 α) por el método de choque térmico (ver **Anexo 2**). A continuación, se extrajo el ADN plasmídico de varias clonas (ver **Anexo 3**) y mediante corrimiento electroforético en gel de agarosa se verificó la presencia del vector. Para obtener a los vectores de expresión se siguieron dos métodos: clonación *IVA* (*In Vivo Assembly*) y clonación tradicional.

```
1      11      21      31      41
MARGKAKEEG SWKKFIWNSE KKEFLGRTGG SWFKILLFYV IFYGCLAGIF IGTIQVMLLT 60
51      61      71      81      91      101
ISEFKPTYQD RVAPPGLTQI PQIQKTEISF RPNDPKSYEE YVRNIVRFLE KYKDSAQKDE 120
121     131     141     151     161     171
MIFEDCGNMP SEIKERGEFN NERGERKVCR FKLEWLGNC S GINDETYGYR DGKPCVLIKL 180
181     191     201     211     221     231
NRVLGFKPKP PKNESLEAYP VMKYSPYVLP VQCTGKRDED KDRIGNVEYF GLGGYPGFPL 240
241     251     261     271     281     291
QYYPYYGKLL QPKYLQPLLA VQFTNLTMDT EIRIECKAYG ENIGYSEKDR FQGRFDVKIE 300
301
VKS 303
```

Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la subunidad β_1 . La flecha verde indica el inicio del dominio extracelular.

5.1.1. Clonación IVA

Para el método de clonación *IVA* (García-Nafría *et al.*, 2016), primero se diseñaron *primers* para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés) del ED β_1 (inserto) y del vector pRSET, los cuales se diseñaron en el *software SnapGene Viewer*. En la **Figura 12** se esquematiza la estrategia para el diseño de *primers* (*Forward* y *Reverse*) y en la **Tabla 4** se enlistan cada uno de ellos. Una consideración importante es que los *primers* que amplifican al vector deben

de incluir además de la secuencia que se une al ADN molde una pequeña secuencia del inserto (I1 y I2, **Figura 12**), para el caso del inserto deben de incluir una pequeña secuencia del vector (V1 y V2, **Figura 12**), estas pequeñas secuencias se introdujeron en el extremo 5´.

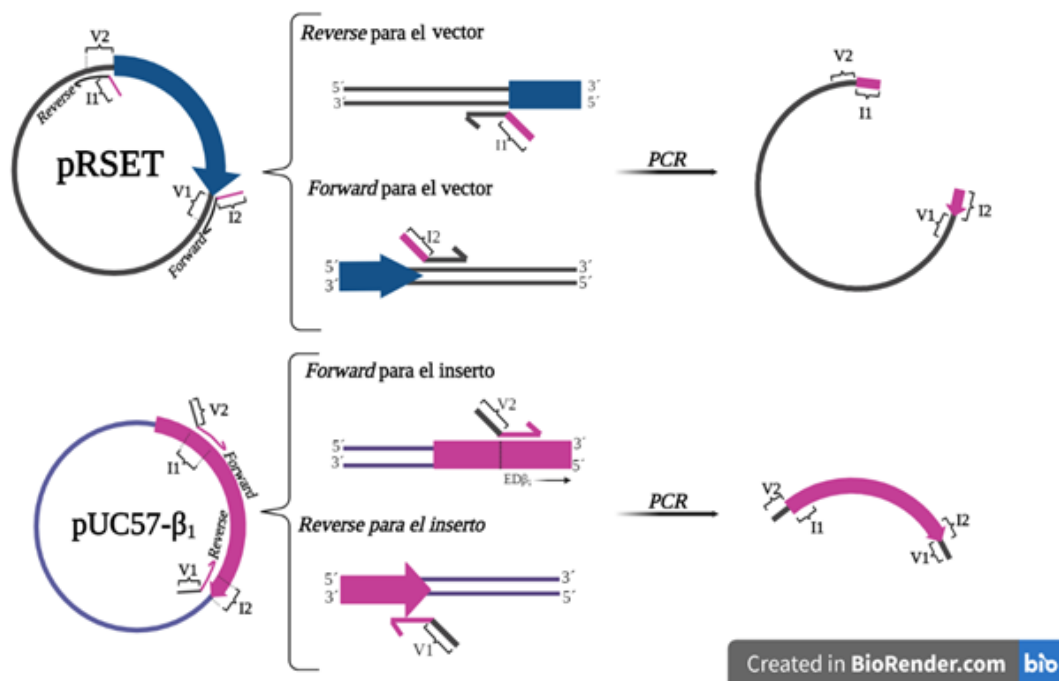


Figura 12. Esquema del diseño de primers Forward y Reverse usados en la PCR del vector pRSET e EDβ₁ siguiendo el método de clonación IVA.

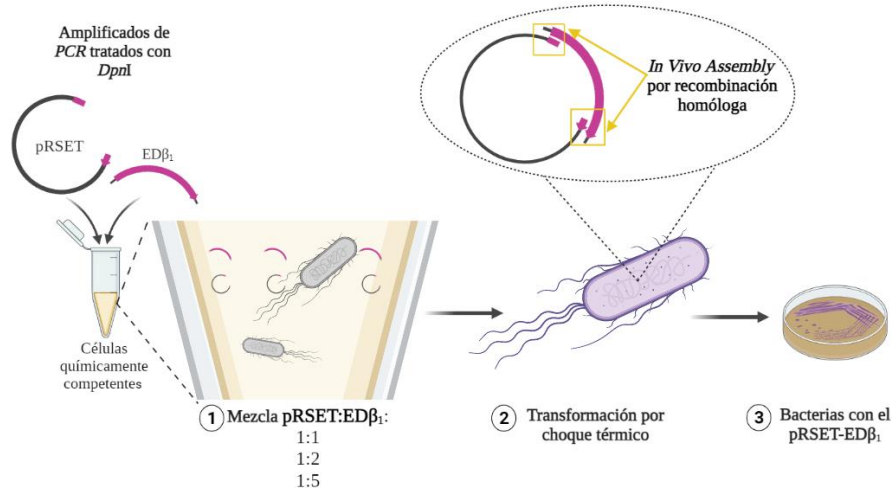
Tabla 4. Secuencia de nucleótidos de los primers empleados en la PCR para el vector pRSET y el EDβ₁

Clave	Secuencia de nucleótidos
EDβ ₁ -Forward	5´CAGGGTGGATCCGAGTTCAAACCG 3´
EDβ ₁ -Reverse	5´ CAAGCTTTTAGCTTTTAACCTC 3´
pRSET-Forward	5´ AAGCTAAAAGCTTGATCCGGCTG 3´
pRSET-Reverse	5´ GGTTTGA ACTCGGATCCACCCTGGAAG 3´

Las reacciones de PCR se prepararon siguiendo el protocolo indicado por el fabricante para la enzima *Phusion High-Fidelity DNA polymerase*. La concentración de ADN molde (pRSET o pUC57-EDβ₁) se varió de 1-10 ng/rxn, también se omitió el uso de dimetilsulfóxido (DMSO). Tal

como lo indica el fabricante, las reacciones se incubaron en un termociclador y se programó un gradiente de temperatura de 50, 53.8, 65.9 y 70 °C en el paso de alineamiento con la finalidad de encontrar la T_m (*melting temperatura*) óptima de hibridación. Los fragmentos amplificados se trataron con la enzima *DpnI* para digerir el ADN molde; para un amplificado de alrededor de 45 µL se adicionaron 5 µL de 10X *NEBuffer* y la enzima siguiendo la relación de 1 µL:1 µg (*DpnI*:ADN). La digestión se incubó durante 30 min a 37 °C y se inactivó incubando a 80 °C durante 20 min.

Para subclonar el ED β_1 en el vector pRSET, como ya se mencionó se siguió el método de clonación *IVA*, el cual se basa en el *In Vivo Assembly* de fragmentos de ADN (vector e inserto) guiados por regiones flanqueantes homólogas cortas (**Figura 12**) que se fusionan mediante recombinación, este proceso es llevado a cabo por *E. coli* (**Figura 13**), aunque el mecanismo exacto aún se desconoce (García-Nafría *et al.*, 2016). El procedimiento consistió en transformar células químicamente competentes *E. coli* TOP10 (DH5 α) (**Anexo 2**) con la mezcla de fragmentos de ADN amplificados por *PCR* (pRSET y el ED β_1) y tratados con la enzima *DpnI* en relaciones de 1:1, 1:2 y 1:5 (ng de vector: ng de inserto), las bacterias transformadas que ensamblaron los fragmentos de ADN fueron las que crecieron en las placas con agar *LB* suplementado con ampicilina.



Created in BioRender.com

Figura 13. Esquema del *In Vivo Assembly* llevado a cabo por *E. coli* TOP10 (DH5 α).

El vector pRSET-ED β_1 codifica en el extremo N-terminal una etiqueta de 6 histidina (6xHis), seguido de un dominio de la lipoamino oxidasa, un sitio de reconocimiento para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV), el sitio de restricción *Bam*HI y el ED β_1 (**Figura 14**). Para evaluar la correcta inserción del ED β_1 dentro del vector de expresión después de la extracción del ADN (**Anexo 2**) de varias clonas, se realizaron dos reacciones de doble restricción, la primera con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, y la segunda con *Xba*I y *Hind*III. Posteriormente mediante secuenciación se corroboró la correcta orientación del inserto. Todas las enzimas de restricción utilizados fueron de la marca *New England BioLabs*.

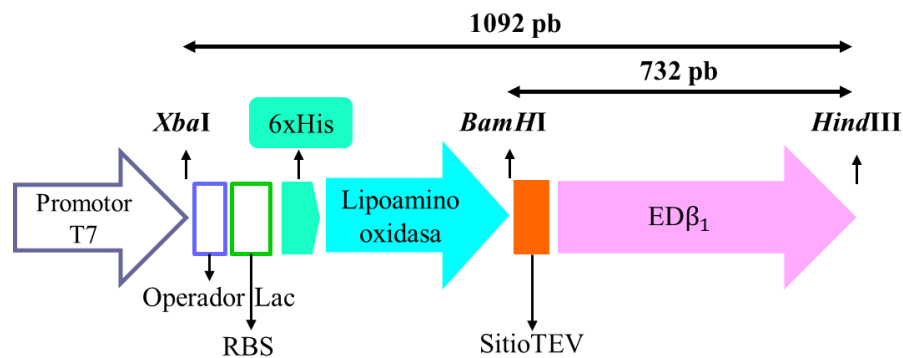


Figura 14. Mapa del ED β_1 subclonado en el vector pRSET por el método de clonación IVA. El ED β_1 está flanqueado entre los sitios de restricción en *Bam*HI y *Hind*III.

5.1.2. Clonación tradicional

Para el método de clonación tradicional, el vector pUC57- β_1 se transformó en células químicamente competentes *E. coli* Mach1 T1 (DH5 α). Posteriormente se extrajo el ADN plasmídico con el kit comercial *QIAGEN Plasmid Kits* (QIAGEN, EE. UU), siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Para la PCR del ED β_1 se usaron *primers* que incluyeron los sitios de restricción en el extremo 5' *Nco*I y 3' *Xho*I (**Tabla 5**), se empleó como molde el vector pUC57- β_1 y a la *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Para preparar las reacciones y el protocolo de amplificación se siguió tal cual las indicaciones del fabricante, incluyendo una concentración del ADN molde de 100-300 ng/rxn. De igual forma en el paso de amplificación se programó un gradiente de temperatura (50, 53.8, 65.9 y 70 °C) para encontrar la *Tm* de hibridación adecuada. El amplificado de PCR se clonó en el vector pCR8/GW/TOPO (pCRTM8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit, Invitrogen), el cual se asignó como pCR8-ED β_1 . Enseguida se transformó en *E. coli* Mach1 T1 (DH5 α) y se extrajo el ADN con el *QIAGEN Plasmid Kits* (QIAGEN, USA). El vector pCR8-ED β_1 y los vectores de expresión del sistema pCri

(pCri-1a, pCri-4a y pCri-8a) (Goulas *et al.*, 2014) se sometieron a una reacción de doble restricción con las enzimas *NcoI* y *XhoI*. Los productos de restricción ED β_1 y los vectores pCri vacíos se purificaron en un gel de agarosa al 1 % con el *QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit* (QIAGEN, USA). Los fragmentos de ADN purificados se ligaron con la enzima *T4 DNA Ligase* (New England BioLabs) y se transformaron en *E. coli* Mach1 T1 (DH5 α) (**Anexo 1**). Cada vector se etiquetó como pCri-1a-ED β_1 , pCri-4a-ED β_1 y pCri-8a-ED β_1 . El ADN de diferentes clonas se extrajo y se analizó mediante ensayos de restricción con las enzimas *NcoI-XhoI* y por secuenciación. Los mapas de cada uno de los vectores obtenidos se muestran en la **Figura 15**, **Figura 16** y **Figura 17**.

Tabla 5. Primers empleados en la PCR del ED β_1 para la inserción en los vectores pCri.

Clave	Secuencia de nucleótidos
Forward	5' GCCATGGAGTTCAAACCGACCTATCAAGATCG 3'
Reverse	5' CTCGAGTTAGCTTTTAAACCTCAATCTTCACGTC 3'

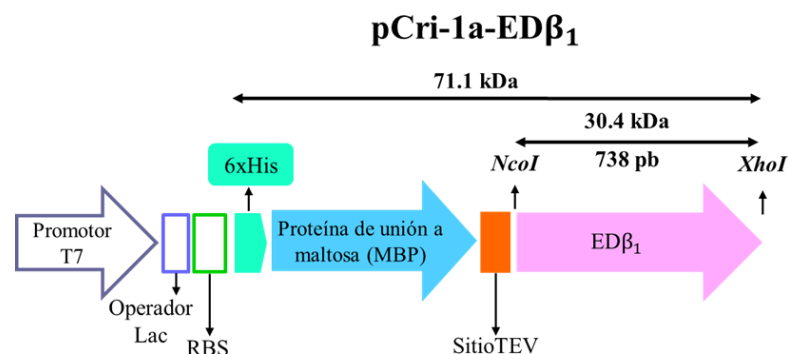


Figura 15. Mapa del vector pCri-1a-ED β_1 , el cual incluye la proteína de unión a maltosa, el peso molecular teórico de la proteína es de 71 kDa.

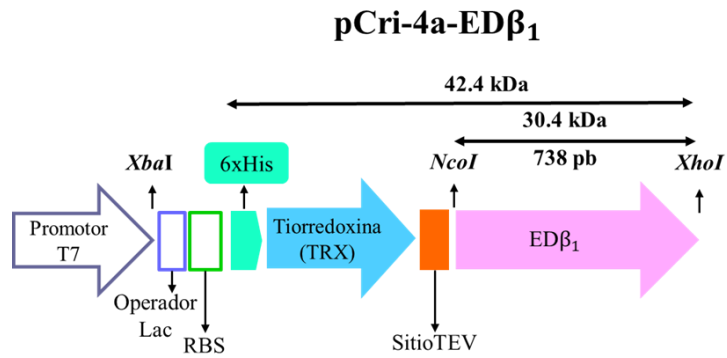


Figura 16. Mapa del vector *pCri-4a-EDβ₁*, el cual incluye la proteína tiorredoxina.

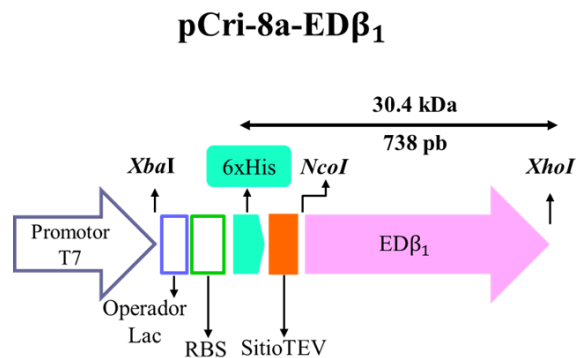


Figura 17. Mapa del vector *pCri-8a-EDβ₁*. El peso molecular del *EDβ₁*.

5.2. Etapa 2: Purificación y replegamiento del *EDβ₁*

Cabe mencionar que con las construcciones *pRSET-EDβ₁* (**Anexo 3**), *pCri-4a-EDβ₁* y *pCri-8a-EDβ₁* la proteína se expresó como IBs. Mientras que con el vector *pCri-1a-EDβ₁* la proteína se expresó tanto en la fracción soluble como en la insoluble. A continuación, se describirá la estrategia experimental.

5.2.1. Expresión del dominio extracelular de la subunidad β_1

E. coli SoluBL21 (DE3) previamente transformada con el vector pRSET-ED β_1 se sembró en 20 mL de caldo *LB* con su antibiótico de selección apropiado (**Anexo 2**), inmediatamente se incubó a 37 °C con agitación orbital constante (150 rpm) durante 12 h. Se inoculó 2 % (v/v) del cultivo anterior en 0.5 L de caldo 2xYT (peptona 16 g/L, extracto de levadura 10 g/L, NaCl 5 g/L) suplementado con ampicilina (50 μ g/ μ L). El cultivo se mantuvo a 37 °C bajo agitación constante (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica (D.O._{600 nm}) de 0.6-0.8. Para iniciar la expresión de la proteína al cultivo *E. coli* SoluBL21 (DE3) se le adicionaron 0.5 L de 2xYT con su respectivo antibiótico a temperatura ambiente, enseguida se adicionó isopropil β -d-galactopiranosido (IPTG) y MgSO₄, ambos hasta una concentración final de 1 mM. El cultivo se incubó a 37 °C durante 16 h con agitación constante (150 rpm). Es importante mencionar que las condiciones de expresión se determinaron previamente mediante pruebas de expresión variando la temperatura de inducción y tiempo de cultivo, para mayor detalle consultar el **Anexo 4**.

E. coli Rosetta (DE3) previamente transformada con pCri-1a-ED β_1 o pCri-8a-ED β_1 (**Anexo 1**) se sembró en 20 mL de caldo *LB*, siguiendo las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. Se empleó 1 L de caldo 2xYT suplementado con kanamicina (50 mg/mL) y cloranfenicol (30 mg/mL) el cual se inoculó con 2 % (v/v) del cultivo del día anterior y se dejó hasta que alcanzara una D.O._{600 nm} de 0.8. Enseguida los cultivos se enfriaron en baño de hielo, para después adicionarles IPTG (1 mM de concentración final) y llevarlos a incubación durante 16 h a 20 °C con agitación contrastante (150 rpm). Las células se concentraron al finalizar su tiempo de incubación por centrifugaron a 5053 \times g durante 35 min, el sobrenadante se descartó y la biomasa se almacenó a -80 °C.

5.2.2. Replegamiento en Ni²⁺-IMAC del ED β_1

La biomasa (~2 g) previamente almacenada (*E. coli* SoluBL21 (DE3) / pRSET-ED β_1) se resuspendió en *buffer* de lisis celular (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, PMFS 1 mM, clorhidrato de benzamidina 1 mM y DTT 1 mM) y se colocó en un baño de hielo, enseguida se sometió a sonicación usando un homogeneizador ultrasónico (500 Watt Cold Palmer, USA) con una amplitud del 50 %. Cada ciclo se realizó alternando 5 s de ultrasonido y 30 s de descanso hasta completar 48 ciclos. Enseguida el lisado celular (fracción total) se centrifugó 3260 \times g durante 10 min a 4 °C.

La pastilla que contenía los cuerpos de inclusión se lavó cinco veces suspendiendo en 10 mL de una solución de Triton-100 al 2 % y EDTA 1 mM, y un lavado final con NaCl 25 mM y Tris 10 mM pH 8.0. Entre cada lavado se homogenizó con vortex y se centrifugó a $3260 \times g$ durante 10 min a 4 °C. Los IBs se solubilizaron en urea 8 M y Tris 8 mM pH 8.0 con agitación vigorosa (150 rpm) durante 12 h a temperatura ambiente.

Los IBs solubilizados (sobrenadante) se centrifugaron a $164,685 \times g$, 30 min a 4 °C. Enseguida, el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.22 μm (Millipore, USA) y para continuar con el replegamiento se aplicó este sobrenadante a una columna de Ni^{2+} -IMAC (5 mL, HisTrap HP, Cytiva, USA) previamente equilibrada con urea 8 M en el FPLC (ÄKTApure 25, Cytiva, USA). Después de cargar la muestra, la columna se lavó con 3 CV (volumen de columna) de urea. Posteriormente, mediante un gradiente lineal (urea 8-0 M) con 5 CV de *buffer* I (Tris 100 mM pH 8.0, L-arginina 400 mM, glutatión reducido (GSH) 5 mM, glutatión oxidado (GSSG) 0.4 mM, glicerol 5 %) con un flujo de 1 mL/min, cuando se alcanzó una concentración de 0 M de urea se continuó con el replegamiento pasando 3 CV de *buffer* I. Por último, se eluyó la proteína con un gradiente lineal (imidazol 0-250 mM) con *buffer* II (Tris 100 mM pH 8.0, L-arginina 400 mM, GSH 5 mM, GSSG 0.4 mM, glicerol 5 %, imidazol 250 mM). Para encontrar las mejores condiciones de unión de los IBs solubilizados a la columna de Ni^{2+} -IMAC se realizaron modificaciones en el *buffer* I y II, las cuales fueron la concentración de L-arginina y de GSH/GSSG. Se realizaron geles SDS-PAGE (**Anexo 5**) para analizar las fracciones recolectadas. Dado que con el vector pRSET el ED β_1 se expresó unido a la lipoamino oxidasa, se realizaron pruebas de escisión con la enzima TEV. Después de la cromatografía Ni^{2+} -IMAC las fracciones que contenían a la proteína de interés se cargaron en una columna de desalinización HiPrep 26/10 (Cytiva, USA) previamente equilibrada con *buffer* I. La proteína se eluyó con 1 CV. Posteriormente la proteína se sometió a proteólisis agregando la enzima TEV en una relación de 100:1 (ED β_1 :TEV), enseguida se incubó a 4 °C durante toda la noche.

5.2.3. Replegamiento del ED β_1 por SEC

Aproximadamente 5g (peso húmedo) de biomasa de *E. coli* Rosetta (DE3) / pCri-8a-ED β_1 se resuspendió en *buffer* de lisis (Tris 20 mM pH 8.5, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM, clorhidrato de benzamidina 1 mM y DTT 1 mM) y se colocó en un baño de hielo, enseguida las células se lisaron

por sonicación usando un homogeneizador ultrasónico (500 Watt Cold Palmer, USA) programando una amplitud al 40 %. El programa consto de 48 ciclos, cada ciclo alternaba 5 s de ultrasonido y 30 s de descanso. Para separar los IBs de la fracción soluble el lisado celular se centrifugó a $33\,349 \times g$ durante 20 min a 4 °C.

El ED β_1 se purificó desde IBs siguiendo la metodología reportada por de la Cruz *et al.* (de la Cruz *et al.*, 2019) con algunas modificaciones para adaptar este método a la proteína de este proyecto, las cuales se describen a continuación. Los IBs se lavaron dos veces en soluciones mediante homogeneización de alto cizallamiento empleando el equipo ULTRA-TURRAX T18 (IKA, Alemania) en el siguiente orden: solución de lavado 1 (Tris 20 mM pH 8,5, NaCl 500 mM, Triton X-100 al 2 % y urea 2 M), solución de lavado 2 (Tris 20 mM pH 8.5, DTT 1 mM y clorhidrato de guanidina 1 M), solución de lavado 3 (Tris 20 mM pH 8.5, DTT 1 mM y Triton X-100 al 1 %) y finalmente la solución de lavado 4 (Tris 20 mM pH 8.5). En cada lavado, los IBs se suspendieron en la solución correspondiente mediante un ciclo de 14, 000 rpm durante 1 min del homogeneizador. Una vez suspendida, la fracción insoluble se recuperó centrifugando a $3260 \times g$ durante 10 min a 4 °C. Los IBs se solubilizaron en *buffer* A (Tris 20 mM pH 8.5, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, DTT 1 mM y urea 8 M) y se incubaron durante 16 h en agitación orbital constante de 150 rpm a 20 °C.

Los cuerpos de inclusión solubilizados (sobrenadante) se recuperaron mediante centrifugación a $164,685 \times g$, durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.22 μm (Millipore, USA) y se aplicó a la columna de Ni $^{2+}$ -IMAC previamente equilibrada con el *buffer* A en el FPLC. Después de cargar la muestra, la columna se lavó con 7 CV de *buffer* A para eliminar las proteínas no unidas. Posteriormente, la proteína se eluyó mediante un gradiente lineal (imidazol 20-500 mM) con *buffer* B (Tris 20 mM pH 8.5, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, DTT 1 mM y urea 8 M) con 7 CV. Todo se trabajó a un flujo de 2 ml/min. Se realizaron geles SDS-PAGE para analizar las fracciones recolectadas.

El replegamiento del ED β_1 se realizó en cromatografía de exclusión por tamaño utilizando la columna Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, USA), ya que esta columna es recomendada para el análisis de proteínas con pesos moleculares entre 30 y 70 kDa. La columna se equilibró con 1.2 CV de *buffer* de replegamiento (Tris 20 mM pH 8.5, NaCl 100 mM, glicerol al 5 %, GSSG 5 mM, GSH 1 mM, L-arginina 400 mM y PMSF 1 mM), el procedimiento requirió de un gradiente lineal de 0.2 CV de urea 0-8 M antes de la inyección de la muestra. Para cada operación de replegamiento, se

aplicó a la columna 1 ml de la muestra obtenida en el paso de purificación anterior. La proteína se eluyó con 1.2 CV de *buffer* de replegamiento. La concentración de la proteína replegada se determinó mediante el ensayo de proteínas de Bradford (Bio-Rad, USA).

5.1.4 Análisis de Western blot

Las proteínas resueltas en los geles de SDS-PAGE del replegamiento en SEC (**Anexo 4**) se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Hybond-P, GE Healthcare) en *buffer* Towbin (Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, metanol 20 %) utilizando una cámara de transferencia semiseca a 25 V durante 40 min. Las membranas con las proteínas transferidas fueron bloqueadas con 5 % de leche descremada y 3 % de seroalbúmina bovina (BSA) en *buffer* TBS-Tween (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, Tween-20 0.2 %) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Enseguida las proteínas de interés se detectaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-histidina (Bethyl Laboratories, USA) o con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-subunidad β de la NKA de perro (MA3-930, Invitrogen, USA) disueltos en TBS-Tween suplementado con leche y BSA, esto se incubó durante toda la noche a 4 °C con agitación suave. Para continuar, las membranas se lavaron 10 veces con TBS-Tween. Los anticuerpos secundarios conjugados con enzima peroxidasa (Zymed Laboratories, USA) se adicionaron e incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, tanto el anticuerpo primario como el secundario fueron de la misma especie. Enseguida las membranas se lavaron 15 veces con TBS-Tween. Para finalizar las proteínas se detectaron con quimioluminiscencia adicionando el reactivo de detección de *Western blotting Amersham™ ECL Select* (Cytiva, USA).

5.3. Etapa 3: Caracterización físicoquímica del ED β ₁

5.3.1. Calibración de la columna Superdex 75

La columna SEC se calibró empleando estándares de proteína del *Gel Filtration Calibration kit* LMW (Cytiva, USA). Las proteínas estándar se prepararon de acuerdo con las indicaciones del fabricante y se aplicaron a la columna Superdex 75 Increase. Para determinar el volumen vacío (V_0) de la columna se consideró el perfil de elución del azul dextrano 200. Posteriormente se determinó el volumen de elución (V_e) para los estándares (conalbúmina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, rinonucleasa A y aprotinina) considerando la altura máxima de los picos de cada proteína. Enseguida

se elaboró la curva de calibración calculando los valores del coeficiente de distribución (K_{av}) con la siguiente ecuación 1:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0} \quad (1)$$

Donde V_c = volumen geométrico de la columna, que para el caso de la Superdex 75 es de 24 mL. Los valores K_{av} se graficaron versus el logarítmico del peso molecular de las proteínas estándar. Posteriormente para complementar se calculó el radio Stoke (R_s) a partir de la ecuación 2 para una proteína globular en su estado nativo (Permyakov *et al.*, 2003).

$$\log \log (R_s) = -(0.204 \pm 0.023) + (0.357 \pm 0.005) \log (MW) \quad (2)$$

5.3.2. Microscopía de fuerza atómica

Los IBs de ED β_1 dispersos en la solución de lavado 4 se analizaron por AFM, para ello se colocaron 5 μ L de muestra sobre un sustrato de mica y se secó durante 15 min con flujo de aire a temperatura ambiente. La muestra se enjuagó tres veces con 5 μ L de agua desionizada filtrada y estéril. Para último, se dejó secar por 15 min con flujo de aire a temperatura ambiente, inmediatamente se hicieron las mediciones en el equipo AFM-Raman NTEGRA SPECTRA (NT-MDT, Moscú, Rusia) utilizando una punta en modo semi-contacto.

5.3.3. Dispersión de luz dinámica

Las mediciones del radio hidrodinámico (r_H) se realizaron sobre los IBs solubilizados y el ED β_1 replegado. La proteína replegada se cambió de *buffer* de replegamiento a PBS en una columna de cromatografía de desalinización HisTrap de 5 ml (Cytiva, USA). Las mediciones se realizaron en

el equipo Zetasizer Nano ZSP con un láser rojo de 632.8 nm a 10 mW (Microtrac, USA) manejando una concentración de 0.5 mg/mL de proteína. Se empleó un volumen de muestra de 500 μ L y una celda de poliestireno desechable.

5.3.4. Espectroscopia de dicroísmo circular

Para analizar la estructura secundaria en el ED β_1 se realizaron mediciones de CD. Las muestras en PBS se analizaron en un espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Easton, MD) equipado con un soporte de celdas tipo Peltier PFD-425S para control de temperatura y agitación magnética. Los espectros de CD se registraron de 200 a 250 nm utilizando una celda de 0.1 cm de longitud de trayectoria. El contenido de la estructura secundaria se estimó a partir de los datos de CD usando BESTSEL (Micsonai *et al.*, 2021).

5.3.5. Espectroscopia Raman

Finalmente se utilizó espectroscopia Raman para detectar cambios estructurales en ED β_1 mediante el seguimiento de los diferentes modos vibracionales de la proteína. Para este análisis se utilizó un sistema Micro Raman con una microscopía BX40 Olympus (Horiba, USA), un láser rojo de estado sólido a 632 nm. Para la preparación de la muestra, la proteína (0.1 mg/mL) en *buffer* A y en *buffer* de replegado se colocó por separado sobre una película de aluminio para su análisis. Los análisis se realizaron a temperatura ambiente escaneando en un rango de 1500-2000 cm^{-1} con una velocidad de escaneo de 10 nm/min y un tiempo de adquisición de 60 s. El espectro de datos fue suavizado con 5 puntos con el método Savitzky-Golay en el *software* Origin.

5.4. Etapa 4: Ensayo de interacción β_1 - β_1

En esta etapa se utilizó la proteína con (6xHis β_1) y sin la etiqueta de His (β_1) para un ensayo de interacción entre subunidades. Primero, la etiqueta de histidina se eliminó con la proteasa TEV de la proteína replegado. La reacción se llevó a cabo en *buffer* de replegamiento a 4 °C durante aproximadamente 10 h. Posteriormente, para separar la etiqueta de histidinas de la proteína de interés

se realizó un paso en Ni²⁺-IMAC, con un procedimiento similar al descrito anteriormente, utilizando *buffer* A1 (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM, imidazol 20 mM, DTT 1 mM) y *buffer* B1 (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM, imidazol 500 mM, DTT 1 mM). El siguiente paso fue mezclar el EDβ₁ con y sin la etiqueta de histidinas en proporción 1:1 (6xHisβ₁-β₁) en un *buffer* que contenía Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM y benzamidina 2 mM. La concentración final fue de 0.4 mg/mL. La mezcla se incubó a 4 °C con agitación suave durante 30 min. La muestra final se aplicó a una columna Ni²⁺-IMAC utilizando los *buffers* A1 y B1 sin DTT. Por separado, se realizaron cromatografías independientes con las versiones 6xHisβ₁ y β₁ como controles. Para analizar las fracciones recolectadas se realizaron geles de SDS-PAGE y Western blot.

CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvieron en total cuatro vectores para expresar al ED β_1 recombinante con la finalidad de producirlo en alta concentración y pureza, con características estructurales y biológicas similares a la proteína nativa de las células epiteliales de riñón de perro, para posteriormente comprobar a nivel atómico la interfaz de interacción entre dos subunidades β_1 . Anteriormente, la NKA de cerdo se ha expresado en *Pichia pastoris* y en *Saccharomyces cerevisiae* para estudios estructurales/funcionales (Cohen *et al.*, 2005; Kolb *et al.*, 2011). Además, existe un trabajo previo que describe la expresión de tres fragmentos del C-terminal de la subunidad β_1 humana en *E. coli* BL21 (DE3), los cuales fueron resistentes a la escisión proteolítica (Bab-Dinitz *et al.*, 2009). Al igual que ocurrió con la expresión de los fragmentos mencionados, el dominio extracelular de la subunidad β_1 de la NKA de perro de este trabajo se expresó como IBs.

En la etapa 1, por el método de clonación *IVA* se obtuvo al vector pRSET-ED β_1 , pero con esta construcción solo se llegó a la etapa 2 (sección 6.1.1.), dado que los resultados obtenidos no fueron los deseables para producir y purificar a la proteína de interés. Por el método de clonación tradicional se obtuvieron tres construcciones con clave pCri-1a-ED β_1 , pCri-4a-ED β_1 y pCri-8a-ED β_1 . Se descartó la proteína unida a la TRX (Cri-4a-ED β_1) dado que se expresó como IBs. Con el vector pCri-1a-ED β_1 la proteína se encontró en la fracción soluble e insoluble. Cuando el ED β_1 se expresó con el plásmido pCri-8a la proteína se encontró en la fracción insoluble en forma de IBs, a partir de aquí se precedió a la etapa 2, 3 y 4. A continuación, se describe a mayor detalle los resultados obtenidos.

6.1. Vectores de expresión

6.1.1. Vector pRSET-ED β_1

Mediante clonación *IVA* se obtuvo al vector pRSET-ED β_1 , este método inicialmente consistió en obtener por *PCR* el vector pRSET y el inserto (gen de interés). En la **Figura 18A y 18B** se muestran los geles de agarosa correspondientes a los amplificadores, el inserto de 745 pares de bases (pb) y el pRSET de 3096 pb, sus *T_m* de hibridación fueron de 50 °C y 70 °C, respectivamente. La relación molar 1:2 (323.5 ng vector:625.6 ng inserto) fue la más adecuada para que *E. coli* ensamblara mediante recombinación homóloga los fragmentos de ADN, esto acorde con los ensayos de doble restricción (**Figura 19A y 19B**). El gel de agarosa de la **Figura 19A** corresponde al ensayo de doble restricción al que sometió el vector pRSET-ED β_1 con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III que flanquean a la secuencia del ED β_1 . En este gel se apreciaron dos bandas de 3072 y 732 pb aproximadamente. Para corroborar aún más la correcta orientación del inserto en el vector se usaron las enzimas *Xba*I y *Hind*III (**Figura 19B**) y se observaron dos bandas alrededor de 2712 y 1092 pb. En ambos ensayos de restricción los pesos de los fragmentos corresponden con los tamaños teóricos (ver sección 5.1.1). La secuencia del marco de lectura se corroboró por secuenciación empleando los *primers* T7-promotor y CIFS1, en la **Figura 20** se muestra el alineamiento múltiple realizado en *Clustal W 2.0* con los datos de los cromatogramas de secuenciación y la secuencia.

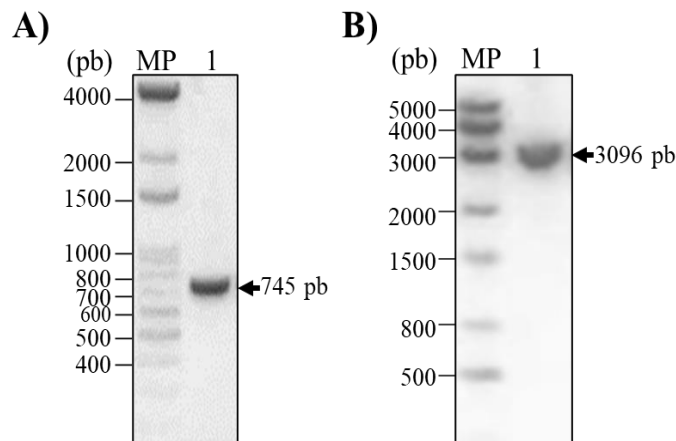


Figura 18. Geles de agarosa al 0.8 % de los productos de PCR empleados para la clonación *IVA*. A) Gel del ED β_1 (carril 1) y B) Gel del vector de expresión (carril 1). El carril MP corresponde al estándar de peso molecular de ADN indicado en pares de bases (pb).

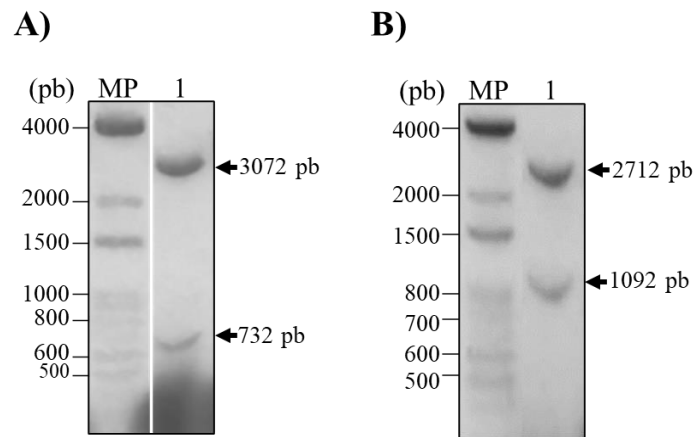


Figura 19. Análisis de la construcción pRSET-ED β_1 . A) gel de agarosa al 0.8 % del ensayo de restricción utilizando las enzimas BamHI y HindIII, los fragmentos resultantes fueron de 3072 y 732 pb (carril 1). B) doble restricción usando las enzimas XbaI y HindIII, se observan dos fragmentos de 2712 y 1092 pb (carril 1). El carril MP es el marcador de peso de ADN en ambos geles.

CLUSTAL W 2.0 Multiple sequence alignment

```

pRSET-EDβ1      FAATACGACTCACTATAGGAGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGG 70
T7-promotor    -----TAATTTGTTTAACTTTAAGAAGG 70
CIFS1          ----- 70

pRSET-EDβ1      AGATATACATATGACCACCAACCACCACAGCGCGCTTTTGAATTTAAGCTGCCGACATTGGCGAA 140
T7-promotor    AGATATACATATGACCACCAACCACCACAGCGCGCTTTTGAATTTAAGCTGCCGACATTGGCGAA 140
CIFS1          ----- 140

pRSET-EDβ1      GGCATCCACGAAGGTGAAATTGTCAAATGGTTTGTGAAACCGGGCGGTGAAGTGAAACGAAGCAGGTAT 210
T7-promotor    GGCATCCACGAAGGTGAAATTGTCAAATGGTTTGTGAAACCGGGCGGTGAAGTGAAACGAAGCAGGTAT 210
CIFS1          ----- 210

pRSET-EDβ1      TGTGCGAAGTGC AAAATGACAAGCGGTTTGC AAAATCCCTCCCGGTCAAAGGGAAGTCTTGAAT 280
T7-promotor    TGTGCGAAGTGC AAAATGACAAGCGGTTTGC AAAATCCCTCCCGGTCAAAGGGAAGTCTTGAAT 280
CIFS1          ----- 280

pRSET-EDβ1      CCTCGTCCCGGAGGGAACAGTGGCAACGGTGGGCAACGCTCATCAGCTCGATGCGCGGTTATGAA 350
T7-promotor    CCTCGTCCCGGAGGGAACAGTGGCAACGGTGGGCAACGCTCATCAGCTCGATGCGCGGTTATGAA 350
CIFS1          ----- 350

pRSET-EDβ1      AACATGACGACCGGACGACACCGGC GAAAACCTGTACTTCAGGGTGGATCCGAGTTC AACCCGACCT 420
T7-promotor    AACATGACGACCGGACGACACCGGC GAAAACCTGTACTTCAGGGTGGATCCGAGTTC AACCCGACCT 420
CIFS1          ----- 420

pRSET-EDβ1      ATCAAGATCGTGTCTCCGCGGCTGACCCAAATCCCGCAGATTCAAAGACCGAAATCAGCTTTCG 490
T7-promotor    ATCAAGATCGTGTCTCCGCGGCTGACCCAAATCCCGCAGATTCAAAGACCGAAATCAGCTTTCG 490
CIFS1          ----- 490

pRSET-EDβ1      TCCGACGACCCGAAAAGCTACGAGGAATATGTGCGTAACATTGTCTGTTTTCTGGAGAAGTATAAAGAT 560
T7-promotor    TCCGACGACCCGAAAAGCTACGAGGAATATGTGCGTAACATTGTCTGTTTTCTGGAGAAGTATAAAGAT 560
CIFS1          ----- 560

pRSET-EDβ1      AGCGCGCAAAGGACGAAATGATCTTCGAGGATTGCGGTAACATGCCGACGAGATTAAAGAACGTGGTG 630
T7-promotor    AGCGCGCAAAGGACGAAATGATCTTCGAGGATTGCGGTAACATGCCGACGAGATTAAAGAACGTGGTG 630
CIFS1          ----- 630

pRSET-EDβ1      AGTTTAAACACGAACGTGCGGAGCGTAAGGTTTGCCTTCAAACCTGGAATGGCTGGCAACTGCAGCGG 700
T7-promotor    AGTTTAAACACGAACGTGCGGAGCGTAAGGTTTGCCTTCAAACCTGGAATGGCTGGCAACTGCAGCGG 700
CIFS1          ----- 700

pRSET-EDβ1      TATCAACGATGAGACCTACGGCTATCGTGACGCAAGCCGTGCGTGTGATTAACCTGAACCGTGTCTG 770
T7-promotor    TATCAACGATGAGACCTACGGCTATCGTGACGCAAGCCGTGCGTGTGATTAACCTGAACCGTGTCTG 770
CIFS1          ----- 770

pRSET-EDβ1      GGTTTTAAAGCCGAAACCGCGAAGAACGAAAGCCTGGAGGCTACCCGGTTATGAAATACAACCCGATG 840
T7-promotor    GGTTTTAAAGCCGAAACCGCGAAGAACGAAAGCCTGGAGGCTACCCGGTTATGAAATACAACCCGATG 840
CIFS1          ----- 840

pRSET-EDβ1      TGCTGCCGGTTCAAGTGCACCGGCAAGCGTGACGAAGATAAAGACCGTATCGGCAACGTGGAGTACTTCGG 910
T7-promotor    TGCTGCCGGTTCAAGTGCACCGGCAAGCGTGACGAAGATAAAGACCGTATCGGCAACGTGGAGTACTTCGG 910
CIFS1          ----- 910

pRSET-EDβ1      TCTGGTGGCTATCCGGCTTCCGCTGCAGTACTATCCGCTACTATGGCAAGCTGCTGCAGCCGAAATAC 980
T7-promotor    TCTGGTGGCTATCCGGCTTCCGCTGCAGTACTATCCGCTACTATGGCAAGCTGCTGCAGCCGAAATAC 980
CIFS1          ----- 980

pRSET-EDβ1      CTGCAACCGCTGCTGGCGGTGCAATTCACCAACCTGACGATGGACACCGAAATCCGTATTGAGTGAAG 1050
T7-promotor    CTGCAACCGCTGCTGGCGGTGCAATTCACCAACCTGACGATGGACACCGAAATCCGTATTGAGTGAAG 1050
CIFS1          ----- 1050

pRSET-EDβ1      CGTACGGCGAAAACATCGGTTATAGCGAGAAAGATCGTTTCCAAGCCGTTTTGACGTGAAGATTGAGGT 1120
T7-promotor    CGTACGGCGAAAACATCGGTTATAGCGAGAAAGATCGTTTCCAAGCCGTTTTGACGTGAAGATTGAGGT 1120
CIFS1          ----- 1120

pRSET-EDβ1      TAAAAGCTAAAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCT 1190
T7-promotor    TAAAAGCTAAAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCT 1190
CIFS1          ----- 1190

pRSET-EDβ1      GAGCAATAACTAGCATAAACCCCTGGGGCTCTAAACGGGCTCTGAGGGGTTTTTTG 1247
T7-promotor    GAGCAATAACTAGCATAAACCCCTGGGGCTCTAAACGGGCTCTGAGGGGTTTTTTG 1247
CIFS1          ----- 1247

```

Figura 20. Alineamiento múltiple con los datos de los cromatogramas de secuenciación del vector pRSET-EDβ₁ con respecto a la secuencia teórica del vector, el sombreado color morado indica el inicio del promotor T7 iniciador y el T7 promotor terminador. El sombreado color menta, magenta, naranja y el rosa claro corresponden el EDβ₁, la etiqueta de 6xHis, la lipomina oxidasasa y el sitio TEV, respectivamente.

6.1.2. Vectores pCri-ED β_1

El gen de la subunidad β_1 del dominio extracelular correspondiente a los residuos 63-303 se clonó en los vectores pCri-1a, pCri-4a y pCri-8a. Primero se realizó la *PCR* del gen de interés como ya se describió en la sección 5.1.2. En la **Figura 21A** se muestra el gel de agarosa del amplificado de 738 pb, las *Tm* de hibridación fueron de 50 °C (carril 1), 53.8 °C (carril 2), 65.9 °C (carril 3) y 70 °C (carril 4). Para clonar en el vector pCR8/GW/TOPO se consideró el amplificado con una *Tm* de 65.9 °C, el cual se purificó previamente del gel de agarosa. La **Figura 21B** corresponde al ADN plasmídico de varias clonas portadoras del pCR8-ED β_1 . Para continuar con la clonación en los vectores pCri se realizó una reacción de doble restricción con las enzimas *NcoI* y *XhoI*, las **Figuras 22A**, **22B** y **22C** corresponden a estas reacciones para el vector pCR8-ED β_1 , pCri-8a, pCri-1a y pCri-4a. Los geles de agarosa fueron elaborados con pozos de mayor tamaño para mejorar la apreciación de las bandas y facilitar su extracción de ADN. A partir de estos geles se purificó el ED β_1 y los tres vectores del sistema pCri con un kit de purificación. Las bandas del pCR8 y de la proteína fluorescente amarilla mejorada (EYFP, por sus siglas en inglés) se descartaron. Después de la ligación entre el gen y los vectores se analizó el ADN plasmídico, en la **Figura 23A** se muestra el gel de agarosa de los vectores pCri-1a-ED β_1 , pCri-4a-ED β_1 y pCri-8a-ED β_1 de aproximadamente 7925, 7125 y 6825 pb, respectivamente. Para confirmar la correcta inserción del gen se llevaron a cabo reacciones de restricción, la **Figura 23B** corresponde a estas reacciones y se observan los productos obtenidos de 725 pb para el ED β_1 . Para terminar de comprobar la correcta inserción, se secuenciaron los vectores usando los *primers* VI, VII y el promotor T7. La **Figura 24** corresponde al alineamiento representativo realizado en *Clustal W 2.0* con los datos de los cromatogramas de secuenciación desde una parte de la secuencia de la MBP hasta el ED β_1 . En la **Figura 25** se muestra el alineamiento de los datos obtenidos de la secuenciación del vector pCri-8a-ED β_1 desde el sitio de unión a ribosoma (RBS, por sus siglas en inglés) hasta el ED β_1 .

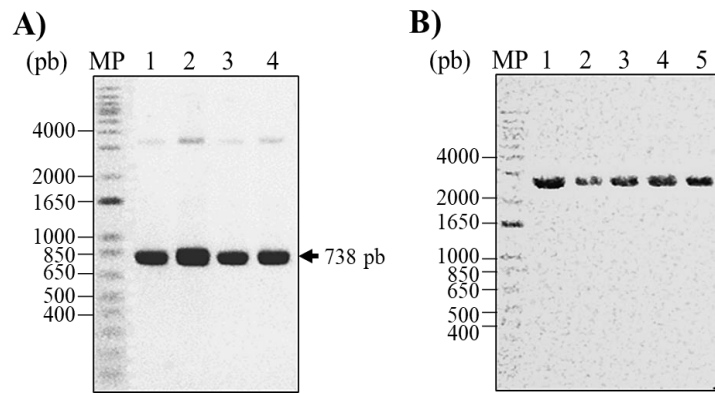


Figura 21. Geles de agarosa al 0.8 % del amplificado por PCR y ADN plasmídico. A) Gel del gen, el carril 1, 2, 3 y 4 corresponde a una T_m de 50, 53.8, 65.9 y 70 °C, respectivamente. B) gel del vector pCR8-ED β_1 de diferentes clonas (carriles 1-5). El carril MP es el marcado de peso molecular en pares de bases (pb).

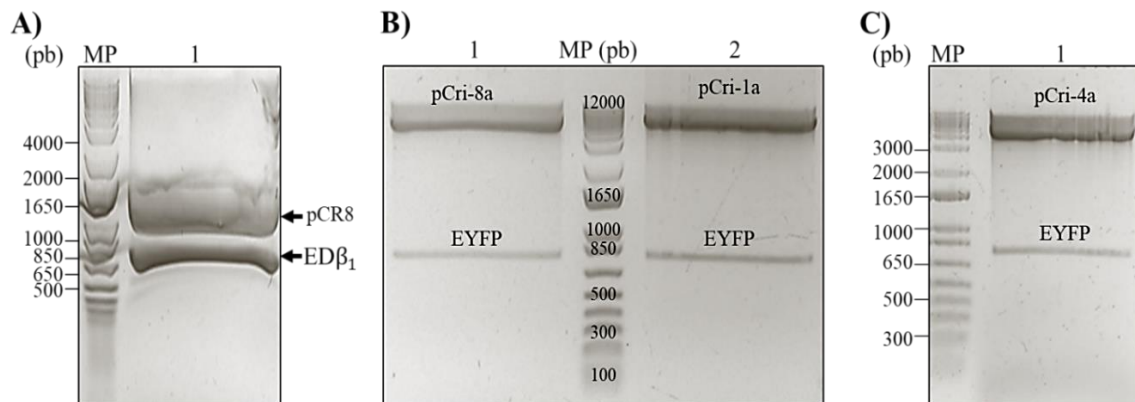


Figura 22. Geles de agarosa al 0.8 % de las reacciones de restricción con las enzimas *NcoI* y *XhoI*. A) Gel de la reacción del vector pCR8-ED β_1 . B) Gel de la reacción del pCri-8a-ED β_1 y pCri-1a-ED β_1 . C) Gel del vector pCri-4a-ED β_1 . En todos los casos se etiquetan los dos fragmentos resultantes y el marcado de peso molecular (MP) en pb.

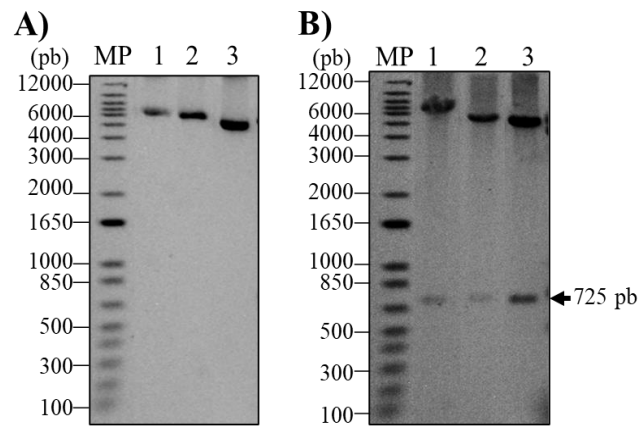


Figura 23. Reacción de doble restricción de los vectores obtenidos con el sistema pCri usando las enzimas *NcoI* y *XhoI*. A) gel de agarosa al 1 % de los vectores; carril 1: pCri-1a-ED β_1 ; carril 2: pCri-4a-ED β_1 ; carril 3: pCri-8a-ED β_1 . B) gel de agarosa al 1 % de las reacciones de doble restricción: carril 1: producto de la reacción de restricción de la construcción pCri-1a-ED β_1 ; carril 2: productos obtenidos de la reacción del vector pCri-4a-ED β_1 y carril 3: productos de la restricción del pCri-1a-ED β_1 .

CLUSTAL 2.1 Multiple sequence alignment

```

VII      -----AGCTGCCTTTAATAAAGGCG
VI
pCrilaEDβ1  ACAAACACATGAATGCAGACCCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCG

VII      AAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGA
VI
pCrilaEDβ1  AAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCAAAGTGA

VII      ATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCG
VI
pCrilaEDβ1  ATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCG

VII      TGCTGAGCGCAGGTATTAAACGCCCGCAGTCCGAACAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCG
VI
pCrilaEDβ1  TGCTGAGCGCAGGTATTAAACGCCCGCAGTCCGAACAAGAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCG

VII      AAAACTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTAAATAAAGACAAACCGTGGGTG
VI
pCrilaEDβ1  AAAACTATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTAAATAAAGACAAACCGTGGGTG

VII      CCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTA
VI
pCrilaEDβ1  CCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTA

VII      TGGAAAACGCCCGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCGCTTCTCGGT
VI
pCrilaEDβ1  TGGAAAACGCCCGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCGCTTCTCGGT

VII      ATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCCGCAGCGGTCTGAGACTGTCGATGAAGCCC
VI
pCrilaEDβ1  ATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCCGCAGCGGTCTGAGACTGTCGATGAAGCCC

VII      TGAAAGACGCGCAGACTAATTCGGGATCTGGCAGTGGTTCTGAGAATCTTTATTTTCAGG
VI
pCrilaEDβ1  TGAAAGACGCGCAGACTAATTCGGGATCTGGCAGTGGTTCTGAGAATCTTTATTTTCAGG

VII      GCGCCATGGAGTTCAAACCGACCTATCAAGATCGTGTGCTCCGCCGGTCTGACCCAAA
VI
pCrilaEDβ1  GCGCCATGGAGTTCAAACCGACCTATCAAGATCGTGTGCTCCGCCGGTCTGACCCAAA

VII      TCCCGCAGATTCAAAGACCGAAATCAGCTTTCGTCGGAACGCCGAAAAGCTACGAGG
VI
pCrilaEDβ1  TCCCGCAGATTCAAAGACCGAAATCAGCTTTCGTCGGAACGCCGAAAAGCTACGAGG

VII      AATATGTGCGTAAACATTGTTCTGTTTCTGGAGAAGTATAAAGATAGCGCGCAAAGGAGC
VI
pCrilaEDβ1  AATATGTGCGTAAACATTGTTCTGTTTCTGGAGAAGTATAAAGATAGCGCGCAAAGGAGC

VII      AATATGATCTTCGAGGATTGCGGTAACATGCCGAGCGAGATTAAGAACCGTGGTGAAGTTA
VI
pCrilaEDβ1  AATATGATCTTCGAGGATTGCGGTAACATGCCGAGCGAGATTAAGAACCGTGGTGAAGTTA
*****

VII      ACAACGAACGTGGCGAGCGTAAGGTTTGCCTTTCAAACCTGGAATGGCTGGGCAACTGCA
VI
pCrilaEDβ1  ACAACGAACGTGGCGAGCGTAAGGTTTGCCTTTCAAACCTGGAATGGCTGGGCAACTGCA
ACAACGAACGTGGCGAGCGTAAGGTTTGCCTTTCAAACCTGGAATGGCTGGGCAACTGCA
*****

VII      GCGGTATCAACGATGAGACCTACGGCTATCGTGACGGCAAGCCGTGCGTGCTGATTAAC
VI
pCrilaEDβ1  GCGGTATCAACGATGAGACCTACGGCTATCGTGACGGCAAGCCGTGCGTGCTGATTAAC
GCGGTATCAACGATGAGACCTACGGCTATCGTGACGGCAAGCCGTGCGTGCTGATTAAC
*****

VII      TGAACCGTGTCTGGGTTTAAAGCCGAAACCGCCGAAAGAACGAAAGCCTGGAGCGTACC
VI
pCrilaEDβ1  TGAACCGTGTCTGGGTTTAAAGCCGAAACCGCCGAAAGAACGAAAGCCTGGAGCGTACC
TGAACCGTGTCTGGGTTTAAAGCCGAAACCGCCGAAAGAACGAAAGCCTGGAGCGTACC
*****

VII      CGGTTATGAAATCAACCCGTATGTGCTGCCGGTTCAGTGCACCGGCAAGCGTGACGAAG
VI
pCrilaEDβ1  CGGTTATGAAATCAACCCGTATGTGCTGCCGGTTCAGTGCACCGGCAAGCGTGACGAAG
CGGTTATGAAATCAACCCGTATGTGCTGCCGGTTCAGTGCACCGGCAAGCGTGACGAAG
*****

VII      ATAAAGACCGTATCGGCAACGTGGAGTACTTCGGTCTGGGTGGCTATCCGGGCTTCCGC
VI
pCrilaEDβ1  ATAAAGACCGTATCGGCAACGTGGAGTACTTCGGTCTGGGTGGCTATCCGGGCTTCCGC
ATAAAGACCGTATCGGCAACGTGGAGTACTTCGGTCTGGGTGGCTATCCGGGCTTCCGC
ATAAAGACCGTATCGGCAACGTGGAGTACTTCGGTCTGGGTGGCTATCCGGGCTTCCGC
*****

VII      TGCAGTACTATCCGTAATGCGCAAGCTGCTGCAGCCGAAATACCTGCAACCGCTGCTGG
VI
pCrilaEDβ1  TGCAGTACTATCCGTAATGCGCAAGCTGCTGCAGCCGAAATACCTGCAACCGCTGCTGG
TGCAGTACTATCCGTAATGCGCAAGCTGCTGCAGCCGAAATACCTGCAACCGCTGCTGG
*****

VII      CCGTGCAATTCACCAACCTGACGATGGACACCGAAATCCGTATTGAGTGAAGCGGTACG
VI
pCrilaEDβ1  CCGTGCAATTCACCAACCTGACGATGGACACCGAAATCCGTATTGAGTGAAGCGGTACG
CGGTGCAATTCACCAACCTGACGATGGACACCGAAATCCGTATTGAGTGAAGCGGTACG
CGGTGCAATTCACCAACCTGACGATGGACACCGAAATCCGTATTGAGTGAAGCGGTACG
*****

VII      GCGAAAACATCGGTTATAGCGAGAAAGATCGTTTCCAAGGCCGTTTTGACGTGAAGATTG
VI
pCrilaEDβ1  GCGAAAACATCGGTTATAGCGAGAAAGATCGTTTCCAAGGCCGTTTTGACGTGAAGATTG
GCGAAAACATCGGTTATAGCGAGAAAGATCGTTTCCAAGGCCGTTTTGACGTGAAGATTG
GCGAAAACATCGGTTATAGCGAGAAAGATCGTTTCCAAGGCCGTTTTGACGTGAAGATTG
*****

VII      AGGTT---
VI
pCrilaEDβ1  AGGTTAAAAGCTAACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAG
AGGTTAAAAGCTAACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAG
*****

VII      -----
VI
pCrilaEDβ1  CCCGAAA
CCCGAAA

```

Figura 24. Alineamiento de los datos de los cromatogramas de secuenciación del vector pCri-1a-EDβ1 con respecto a la secuencia teórica, se muestra una parte de la secuencia de la MBP en color lila. El sombreado color naranja indica el sitio TEV y en el color rosa claro el EDβ1

CLUSTAL 2.1 Multiple sequence alignment

```

pCri8aEDβ1      TTTCCTTAACCTTAAGAAGGAGATATCATATATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCA
T7              TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATCATATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACA
VI              -----

pCri8aEDβ1      GCAGCGGCGAAAACCTTTACTTCCAGGGCGCCATGGAGTTCAAACCGACCTATCAAGATC
T7              GCAGCGGCGAAAACCTTTACTTCCAGGGCGCCATGGAGTTCAAACCGACCTATCAAGATC
VI              -----

pCri8aEDβ1      GTGTGTGCTCCGCCGGTCTGACCCAAATCCCAGATTCAAAGACCGAAATCAGCTTTC
T7              GTGTGTGCTCCGCCGGTCTGACCCAAATCCCAGATTCAAAGACCGAAATCAGCTTTC
VI              -----

pCri8aEDβ1      GTCCGAACGACCCGAAAAGCTACGAGGAATATGTCGTAACATTGTTTCGTTTTCTGGAGA
T7              GTCCGAACGACCCGAAAAGCTACGAGGAATATGTCGTAACATTGTTTCGTTTTCTGGAGA
VI              -----

pCri8aEDβ1      AGTATAAAGATAGCGCGCAAAAAGGACGAAATGATCTTCGAGGATTGCGGTAACATGCCGA
T7              AGTATAAAGATAGCGCGCAAAAAGGACGAAATGATCTTCGAGGATTGCGGTAACATGCCGA
VI              -----

pCri8aEDβ1      GCGAGATTAAGAAGCTGGTGTAGTTTAAACAACGACGTGGCGAGCGTAAGGTTTGCCTG
T7              GCGAGATTAAGAAGCTGGTGTAGTTTAAACAACGACGTGGCGAGCGTAAGGTTTGCCTG
VI              --GAGATTAAGAAGCTGGTGTAGTTTAAACAACGACGTGGCGAGCGTAAGGTTTGCCTG
                    *****

pCri8aEDβ1      TCAAACCTGGAATGGTGGGCAACTGCAGCGGTATCAACGATGAGACCTACGGCTATCGTG
T7              TCAAACCTGGAATGGTGGGCAACTGCAGCGGTATCAACGATGAGACCTACGGCTATCGTG
VI              TCAAACCTGGAATGGTGGGCAACTGCAGCGGTATCAACGATGAGACCTACGGCTATCGTG
                    *****

pCri8aEDβ1      ACGGCAAGCCGTGCGTGTGATTAACCTGAACCGTGTCTGGGTTTTAAGCCGAAACCCG
T7              ACGGCAAGCCGTGCGTGTGATTAACCTGAACCGTGTCTGGGTTTTAAGCCGAAACCCG
VI              ACGGCAAGCCGTGCGTGTGATTAACCTGAACCGTGTCTGGGTTTTAAGCCGAAACCCG
                    *****

pCri8aEDβ1      CGAAGAACGAAAGCCTGGAGGCGTACCCGGTTATGAAATACAACCCGTATGTGCTGCCGG
T7              CGAAGAACGAAAGCCTGGAGGCGTACCCGGTTATGAAATACAACCCGTATGTGCTGCCGG
VI              CGAAGAACGAAAGCCTGGAGGCGTACCCGGTTATGAAATACAACCCGTATGTGCTGCCGG
                    *****

pCri8aEDβ1      TTCAGTGCACCGGCAAGCGTACGAAAGATAAAGACCGTATCGGCAACGTGGAGTACTTCG
T7              TTCAGTGCACCGGCAAGCGTACGAAAGATAAAGACCGTATCGGCAACGTGGAGTACTTCG
VI              TTCAGTGCACCGGCAAGCGTACGAAAGATAAAGACCGTATCGGCAACGTGGAGTACTTCG
                    *****

pCri8aEDβ1      GTCGTGGGTGGCTATCCGGGCTTCCCGTGCAGTACTATCCGTAATGACGATGCTGCTG
T7              GTCGTGGGTGGCTATCCGGGCTTCCCGTGCAGTACTATCCGTAATGACGATGCTGCTG
VI              GTCGTGGGTGGCTATCCGGGCTTCCCGTGCAGTACTATCCGTAATGACGATGCTGCTG
                    *****

pCri8aEDβ1      AGCCGAAATACCTGCAACCGTGTGGCGGTGCAATTCACCAACCTGACGATGGACACCG
T7              AGCCGAAATACCTGCAACCGTGTGGCGGTGCAATTCACCAACCTGACGATGGACACCG
VI              AGCCGAAATACCTGCAACCGTGTGGCGGTGCAATTCACCAACCTGACGATGGACACCG
                    *****

pCri8aEDβ1      AAATCCGTATTGAGTGCAAGGCGTACGGCGAAAACATCGGTTATAGCGAGAAGATCGTT
T7              AAATCCGTATTGAGTGCAAGGCGTACGGCGAAAACATCGGTTATAGCGAGAAGATCGTT
VI              AAATCCGTATTGAGTGCAAGGCGTACGGCGAAAACATCGGTTATAGCGAGAAGATCGTT
                    *****

pCri8aEDβ1      TCCAAGGCCGTTTTGACGTGAAGATTGAGGTTAAAAGCTAACTCGAGCACCACCACC
T7              TCCAAGGCCGTTTTGACGTGAAGATTGAGGTTAAAAGCTAACTCGAGCACCACCACC
VI              TCCAAGGCCGTTTTGACGTGAAGATTGAGGTTAAAAGCTAACTCGAGCACCACCACC
                    *****

pCri8aEDβ1      ACCACTGA
T7              ACCACTGA
VI              ACCACTGA
                    *****

```

Figura 25. Alineamiento de los datos de los cromatogramas de secuenciación del vector pCri-8a-EDβ1 con respecto a la secuencia teórica del vector, en color verde se destaca el sitio de unión a ribosoma (RBS), en color menta la etiqueta 6xHis, en color naranja el sitio TEV y en el color rosa claro el EDβ1.

6.2.3. Pruebas de expresión del ED β ₁

Estas pruebas tuvieron como objetivo determinar si la proteína era expresada por la bacteria y la forma en que lo estaba haciendo, soluble o como IBs. En la prueba de expresión primero se cultivó a *E. coli* BL21 (DE3)/pRSET-ED β ₁ bajo las condiciones mencionadas en la etapa 2 de la metodología. La **Figura 26** corresponde al gel SDS-PAGE de este análisis después de la lisis celular y centrifugación, el carril 1 es la fracción insoluble y el carril 2 la fracción soluble, es evidente una banda de alrededor de 39.9 kDa en la fracción insoluble que corresponde al ED β ₁ unido a la lipoproteína oxidasa y a la etiqueta 6xHis (ver **Figura 14**). Es importante indicar que de aquí en adelante todos los geles SDS-PAGE que se presentan fueron teñidos con Coomassie azul brillante G 250.

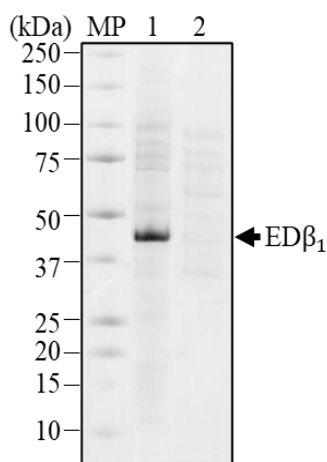


Figura 26. Gel SDS-PAGE del análisis después de la lisis celular de la biomasa de *E. coli* BL21 (DE3)/pRSET- ED β ₁. Carril 1: fracción insoluble y carril 2: fracción soluble. El carril MP es el marcado de peso molecular para proteínas en kDa.

Para el caso de los vectores pCri-ED β ₁ se empleó a *E. coli* Rosetta (DE3) previamente transformada para la prueba de expresión y análisis por SDS-PAGE después de la lisis celular. Con el vector pCri-1a-ED β ₁ la proteína se expresó tanto en la fracción soluble como la insoluble, la proteína tuvo un peso molecular de 71.1 kDa (**Figura 27A**), con el vector pCri-4a-ED β ₁ y pCri-8a-ED β ₁ la

proteína se expresó totalmente en la fracción insoluble, así como se muestra en la **Figura 27A** carril 3 y **Figura 27B** carril 1, ambas con un peso de 42.4 kDa y 30.4 kDa, respectivamente.

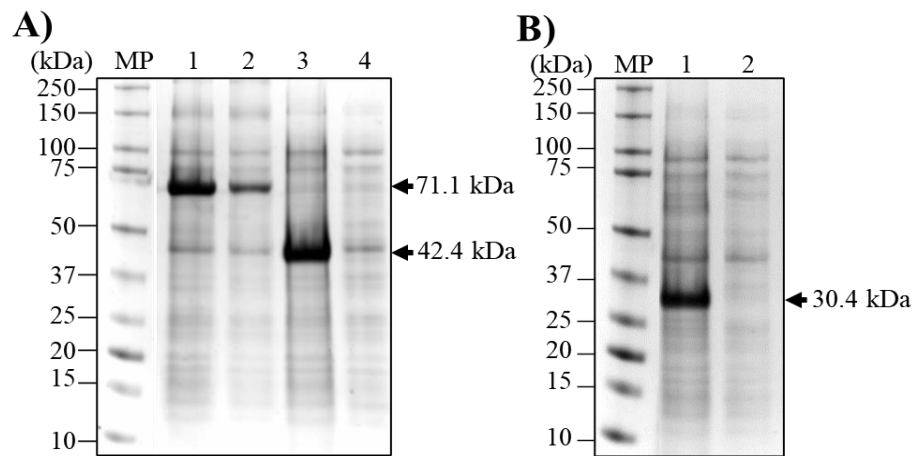


Figura 27. Análisis de la prueba de expresión del ED β_1 con el sistema pCri. A) SDS-PAGE de las fracciones insolubles (carriles 1 y 3) y solubles (carriles 2 y 4), el cultivo de *E. coli* Rosetta/ pCri-1a-ED β_1 se analizó en los carriles 1 y 2, para el caso de *E. coli* Rosetta/ pCri-4a-ED β_1 se usaron los carriles 3 y 4. B) gel SDS-PAGE de la lisis celular de *E. coli* Rosetta/ pCri-8a-ED β_1 , la fracción insoluble es el carril 1 y la fracción soluble el carril 2. En ambos geles se indica el marcador de peso (MP en kDa) y con una flecha negra los pesos moleculares de las proteínas.

6.2. Purificación y replegamiento del ED β_1

6.2.1. Replegamiento en Ni²⁺-IMAC: vector pRSET-ED β_1

Como ya se ha venido mencionando, las proteínas que se expresan como cuerpos de inclusión requieren un tratamiento adicional para su correcto aislamiento, solubilización y replegamiento. La **Figura 28** muestra el análisis por SDS-PAGE de los sobrenadantes después de centrifugar entre cada lavado (sección 5.2.2). Posteriormente se procedió a desnaturalizar en presencia de urea, seguido del replegamiento por cromatografía usando una columna de Ni²⁺-IMAC y programando un doble gradiente en el FPLC. Idealmente la proteína plegada debe eluir hasta en el segundo gradiente donde ya se eliminó por completo a la urea. Sin embargo, observamos que cuando se empleó el *buffer* I y II con todos sus componentes (ver sección 5.2.2), o cuando se omitió el uso de agentes redox (GSH/GSSG) o se bajó la concentración de L-arginina a 100 mM, el ED β_1 se eluyó en el primer gradiente aun en presencia del agente desnaturalizante, tal como se aprecia en los cromatogramas de

las **Figuras 29A, 29B y 29C**, donde la proteína eluyó a concentración de 2.29, 2.32 y 1.61 M de urea, respectivamente. Se encontró que el ED β_1 se eluyó en el segundo gradiente cuando se empleó *buffer* I y II en ausencia de L-arginina, con un máximo de absorbancia a una concentración de imidazol de 181.30 mM (**Figura 29D**). Se ha reportado que la L-arginina mejora la eficiencia de replegamiento de proteínas recombinantes por su capacidad para suprimir la agregación de los intermediarios de plegamiento (Arakawa & Tsumoto, 2003), sin embargo, en el replegamiento del ED β_1 por cromatografía de Ni²⁺-IMAC la L-arginina obstaculizó la unión entre 6xHis y Ni²⁺. Por consiguiente, la arginina no solo previene las interacciones proteína-proteína sino también las interacciones proteína-matriz no específicas (Kudou *et al.*, 2015). Estudios previos han encontrado que claramente la arginina interfiere con la unión de proteínas a la columna de Ni²⁺-IMAC y que está relacionado con la concentración, se ha reportado que a concentraciones inferiores de 200 mM se reduce esta obstaculización de unión (Abe *et al.*, 2009). No obstante, otros reportes han demostrado que se requiere una mayor concentración de Arg (500 mM) para la purificación de la β -1,3-xilanasasa (Kudou *et al.*, 2015). En general, se tiene como propuesta que los grupos aminos de la L-arginina compiten con la etiqueta de histidina por la unión de metales.

El análisis de las fracciones colectadas bajo las diferentes condiciones probadas se muestra en la **Figura 30**, en el carril 1 se pueden apreciar la banda de los IBs solubilizados antes de ser aplicados a la columna y en los carriles 2-4 las distintas fracciones del pico de elución. El siguiente paso fue eliminar del extremo N-terminal a la lipoamino oxidasa y a la etiqueta 6xHis, para esto se usó la enzima TEV. El resultado de esta incisión fue que la proteína se precipitó, por consiguiente, se buscaron otras alternativas. Incluyeron el uso de otras proteínas de fusión, otras cepas de expresión, variables como la temperatura de expresión, así como, cambiar el método de recuperación de los IBs y replegamiento de la proteína.

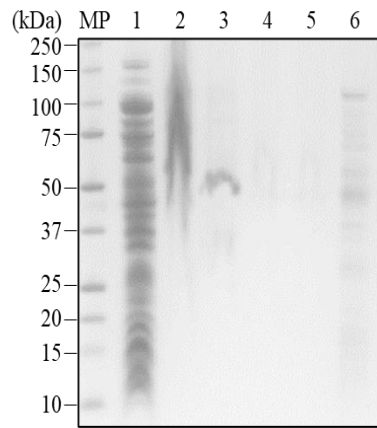


Figura 28. Gel SDS-PAGE del análisis del sobrenadante después de los lavados de los IBs, carriles 1-5: lavados con Triton-100 2% y EDTA 1 mM; carril 6: lavado final con NaCl 25 mM y Tris 10 mM. Se indica el marcado de peso (MP) en kDa.

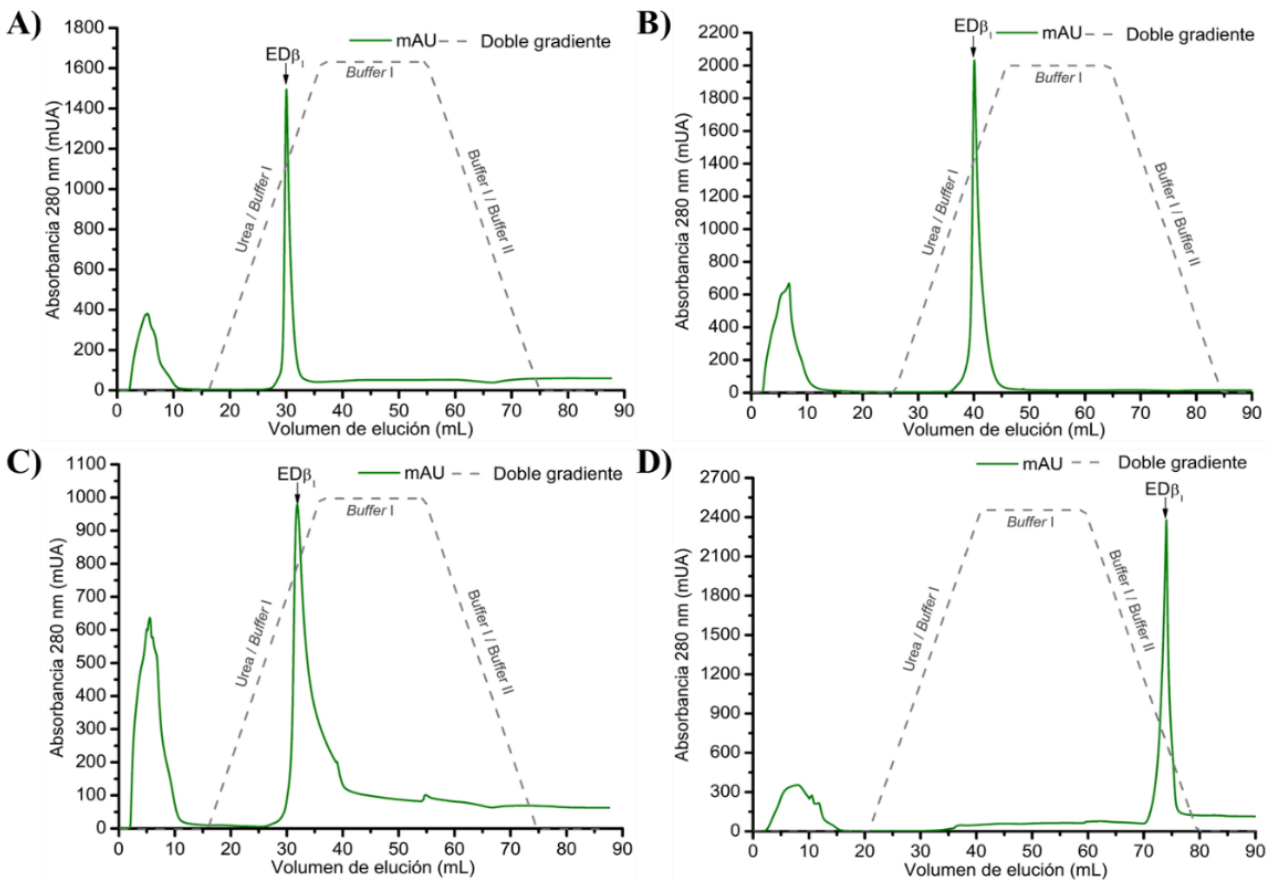


Figura 29. Cromatogramas de Ni^{2+} -IMAC del replegamiento por doble gradiente. A) Condiciones iniciales, B) buffers sin GSH/GSSG, C) buffers con una concentración de L-arginina 100 mM y D) buffers en ausencia de L-arginina. En todos los casos se señala el doble gradiente con la línea discontinua.

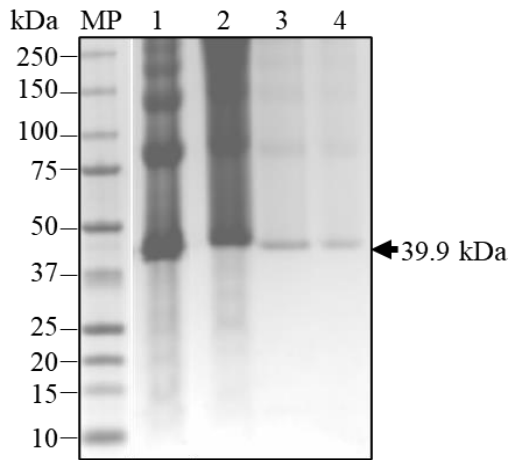


Figura 30. Gel SDS-PAGE del replegamiento por doble gradiente usando buffers en ausencia de *L*-arginina. Carril MP: marcado de peso molecular en kDa; carril 1: IBs solubilizados; carril 2-3: fracciones del pico eluido en el segundo gradiente.

6.2.2. Replegamiento en cromatografía de exclusión por tamaño: vector pCri-8a-ED β ₁

A partir del lisado celular de la biomasa de *E. coli* Rosetta (DE3)/pCri-8a-ED β ₁ se recuperó por centrifugación los IBs, seguido de una serie de lavados (sección 5.2.3.). En la **Figura 31** se muestra el gel SDS-PAGE del análisis de los sobrenadantes después de centrifugar entre cada lavado. En ninguno de los lavados hubo pérdidas significativas del ED β ₁. La distribución de tamaño y morfología de los IBs previo a su solubilización se analizó por DLS y AFM. La **Figura 32A** muestra a los IBs aislados con dos distribuciones de tamaño en r_H con una moda de 18.9 ± 3.0 nm y 265.5 ± 37.5 nm cada una. La micrografía AFM reveló que los IBs tenían una morfología esférica (**Figura 32B**), además, de corroborar la moda con tamaños más grande proporcionada por DLS. Este método de aislamiento permitió obtener tamaños de partícula principalmente homogéneos. La homogeneización de alto cizallamiento proporciona un tamaño de finura de 10-50 μ m y el uso de diferentes soluciones de lavado que incluyen el uso de Triton X-100, una baja concentración de GuHCl, DTT y un pH alcalino entre cada paso de lavado permiten la eliminación de moléculas contaminantes. En este contexto, el tipo de método ya sea mecánico o químico empleado para la recuperación de IBs de bacterias influye en la actividad biológica del producto final (Gast & Modler, 2008; Peternel & Komel, 2010).

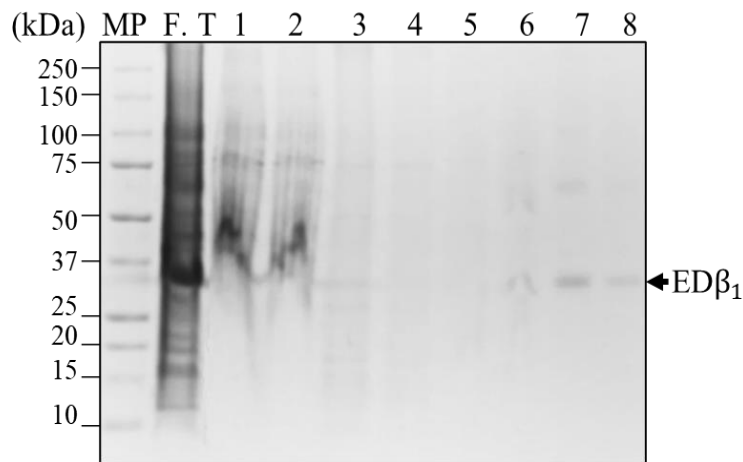


Figura 31. Gel SDS-PAGE de los sobrenadantes de los lavados de los IBs.

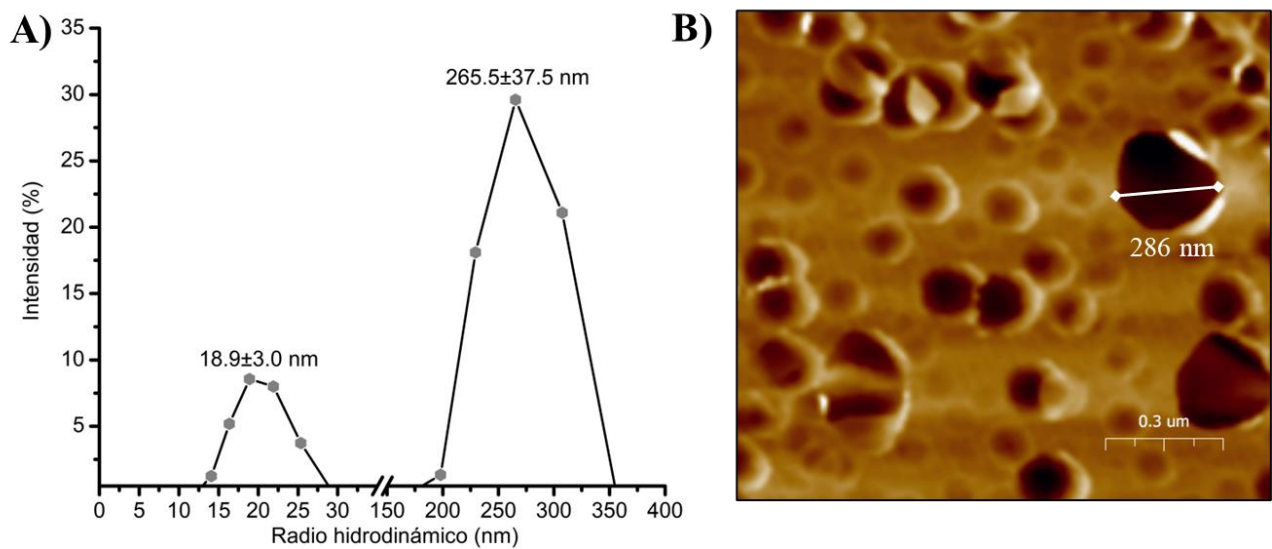


Figura 32. Caracterización de los IBs previo a ser solubilizados en urea. A) medición del radio hidrodinámico de los IBs no solubilizados por DLS. B) micrografía de AFM de los IBs con una morfología esférica.

Los IBs solubilizados se purificaron por Ni²⁺-IMAC en condiciones desnaturizantes, el cromatograma del perfil de elución se muestra en la **Figura 33A**, el EDβ₁ eluyó a una concentración de 106-211 mM imidazol. Las fracciones colectadas se analizaron por SDS-PAGE (**Figura 33B**) y *Western blot* (**Figura 33C**). Se apreció una banda de aproximadamente 30.4 kDa (carriles 1-4,

Figura 33B) la cual coincide con el peso molecular teórico esperado. Adicionalmente, se observaron bandas de mayor peso molecular las cuales corresponden a estados oligoméricos del ED β_1 (HOS-ED β_1) como lo confirma el análisis WB (**Figura 33C**).

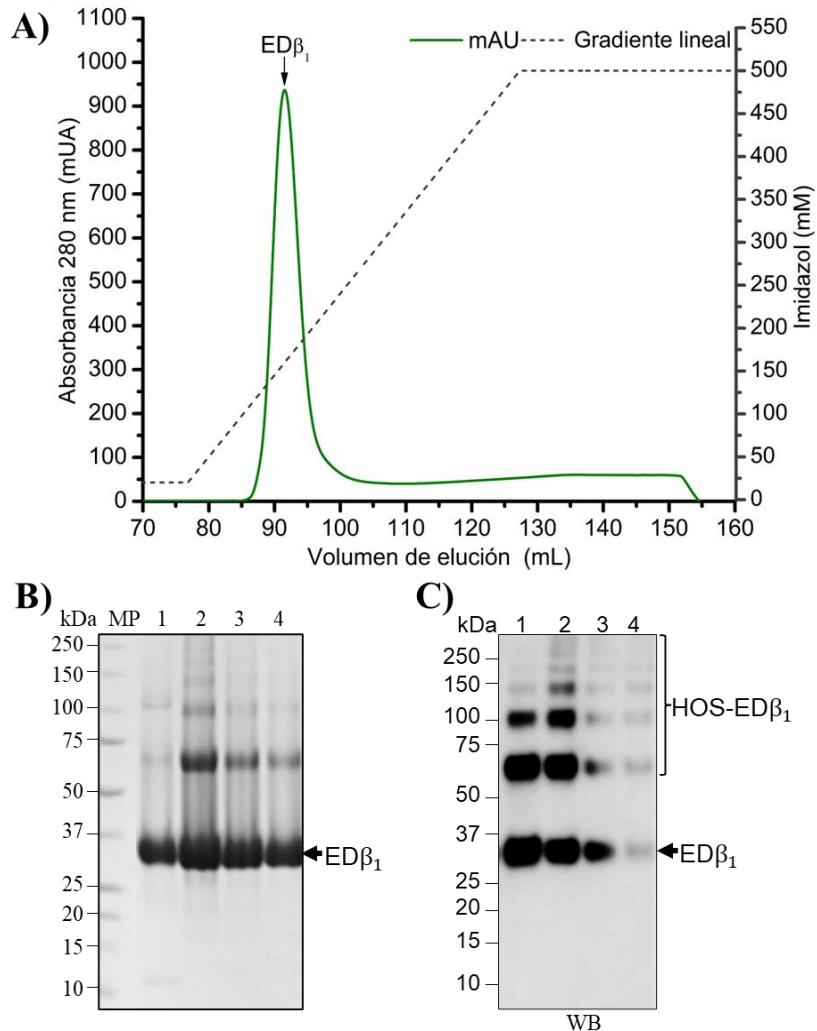


Figura 33. Purificación de los IBs solubilizados. A) cromatografía de Ni²⁺-IMAC de los IBs solubilizados. B) gel SDS-PAGE de las fracciones recolectadas (carriles 1-4) del pico del perfil de elución del ED β_1 solubilizado (30.4 kDa) y C) identificación del ED β_1 por Western blot (WB) y bandas de mayor peso molecular (HOS) en las fracciones recolectadas (carril 1-4) con el anticuerpo anti-subunidad β_1 de la NKA de perro.

Después del paso de purificación en Ni²⁺-IMAC del EDβ₁ solubilizado, se procedió al replegamiento por SEC. En el perfil de elución en línea azul de la **Figura 34** corresponde al EDβ₁ plegado y se distinguen tres sectores cromatográficos I, II y III, las cuales tuvieron un V_e de 9.14 mL, 10.11 mL y 10.66 mL, respectivamente. Las fracciones correspondientes a cada sector del perfil de elución se analizaron en SDS-PAGE (**Figura 35A**). Se observó que los sectores I y II tienen bandas de mayor peso molecular que se atribuyeron a las formas agregadas del EDβ₁ y también está presente la banda de 30.4 kDa. Esto contrasta con el sector III, donde solo se observó la banda de 30.4 kDa. La detección de *Western blot* de la **Figura 35B** confirmó que las bandas observadas en SDS-PAGE corresponden completamente a EDβ₁. Para determinar el volumen vacío (V_o) se procedió a calibrar la columna Superdex 75, la **Figura 36** corresponde al cromatograma del perfil de elución de los estándares; los primeros 8.4 mL después de la inyección de la muestra corresponden al azul dextrano 2000 (estándar 1), este corresponde a los solutos que no interactúan con la resina de la columna. El volumen de elución (V_e) de cada proteína estándar se resumen en la **Tabla 6**. Un aspecto importante en el replegamiento del EDβ₁ en SEC fue la adaptación de la composición del *buffer* de replegamiento anteriormente reportado por de la Cruz *et al.* (2019). En la misma **Figura 34A** pero con línea punteada se muestra en comparativa el EDβ₁ no plegado cuando se usó en el *buffer* de replegamiento un sistema redox a baja concentración (GSSG 0.4 mM / GSH 0.2 mM) y sin L-arginina. En este perfil de elución se aprecia un pico (V_e = 8.79 mL) con un hombro ancho que se extiende hasta los 15.01 mL, de igual forma se observa un segundo pico con un V_e = 18.70 mL, este último se asignó a la proteína que se agregó y la cual migra a lo largo de la columna junto con la urea, es decir, se volvió a desnaturalizar parcialmente. Además, de acuerdo con los estándares la proteína de menor tamaño molecular es la aprotinina con 6.5 kDa y tiene un V_e de 16.8 mL. Por lo tanto, la presencia del sistema redox de GSSG 5 mM / GSH 1 mM y L-arginina 400 mM en el *buffer* replegamiento (línea azul, **Figura 34A**) es esencial. Se ha informado que el sistema redox promueve la formación de enlaces disulfuro nativos y el EDβ₁ contiene tres puentes disulfuro (Käthi Geering, 2001). Es necesario resaltar que el correcto plegamiento en un alto rendimiento de las proteínas ricas en cisteína necesita de *buffers* que contengan glutatión, arginina o cisteamina (Moghadam *et al.*, 2015). Agregando a lo anterior, la L-arginina se ha utilizado favorablemente como un supresor de la agregación en el proceso de replegamiento de proteínas con diferentes propiedades físicas y químicas (Bajorunaite *et al.*, 2007).

Otro punto importante por destacar es que el método de replegamiento en SEC requiere un gradiente de 0.2 CV de urea antes de inyectar a la proteína solubilizada, ya que se observó que cuando

se utilizó 0.1 CV de urea la proteína de interés estaba presente en dos secciones cromatográficas, en la primera con un pico de $V_e = 9.21$ mL y la segunda con un $V_e = 18.71$ mL. Si se omite el uso del gradiente de urea tiene un comportamiento similar, el primer pico ($V_e = 8.64$ mL) con un pequeño hombro que se extiende hasta los 17.56 mL y una segunda sección cromatográfica que se empieza a eluir a los 19.98 mL. El replegamiento en SEC ofrece ciertas ventajas sobre los métodos más utilizados (Werner *et al.*, 1994), como separar la forma plegada de las formas agregadas y mal plegadas (Singh *et al.*, 2015), además, evita la dilución descontrolada de la proteína, llevando a la proteína a un ambiente libre de desnaturalizantes, es por ello que es importante incluir el gradiente de 0.2 CV de urea antes de inyectar la proteína desnaturalizada, efecto que observamos claramente en los perfiles de elución de la **Figura 37**. Esto sugiere que el $ED\beta_1$ no debería sufrir un cambio rápido de las condiciones de desnaturalización al *buffer* de replegamiento. El rendimiento final por litro de cultivo de los pasos de replegamiento se resumen en la **Tabla 7**. Para los sectores I/II y el sector III (**Figura 34**) fue de hasta 12.35 mg y 9.67 mg, respectivamente.

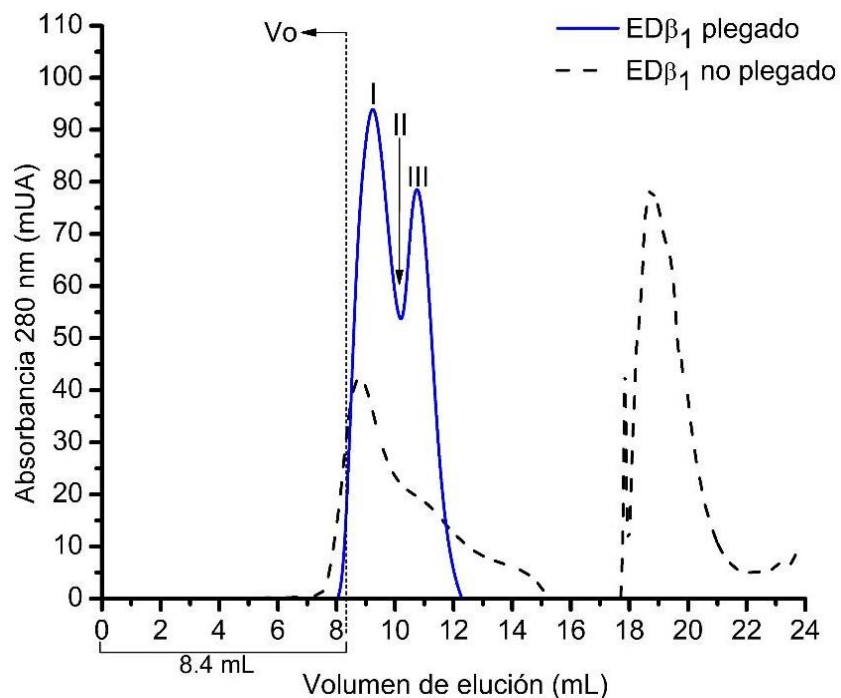


Figura 34. Replegamiento de $ED\beta_1$ por SEC. La línea azul es perfil de elución del $ED\beta_1$ plegado con los sectores cromatográficos I, II y III vs. $ED\beta_1$ no plegado en línea punteada.

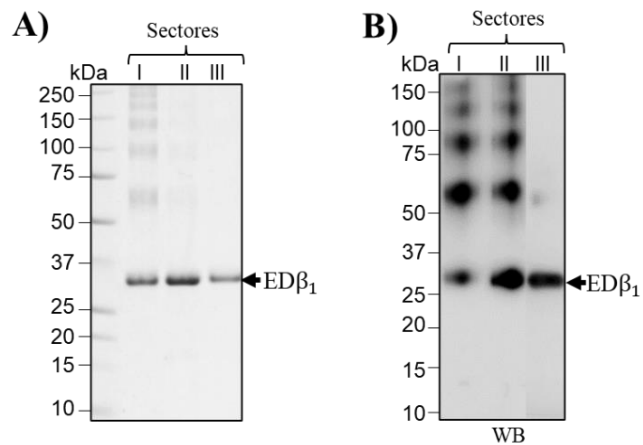


Figura 35. Replegamiento de $ED\beta_1$ por SEC. A) SDS-PAGE de las fracciones recolectadas de los sectores cromatográficos y B) Western blot (WB) para la detección del replegamiento de $ED\beta_1$ por SEC usando un anticuerpo contra la subunidad β_1 de perro de NKA.

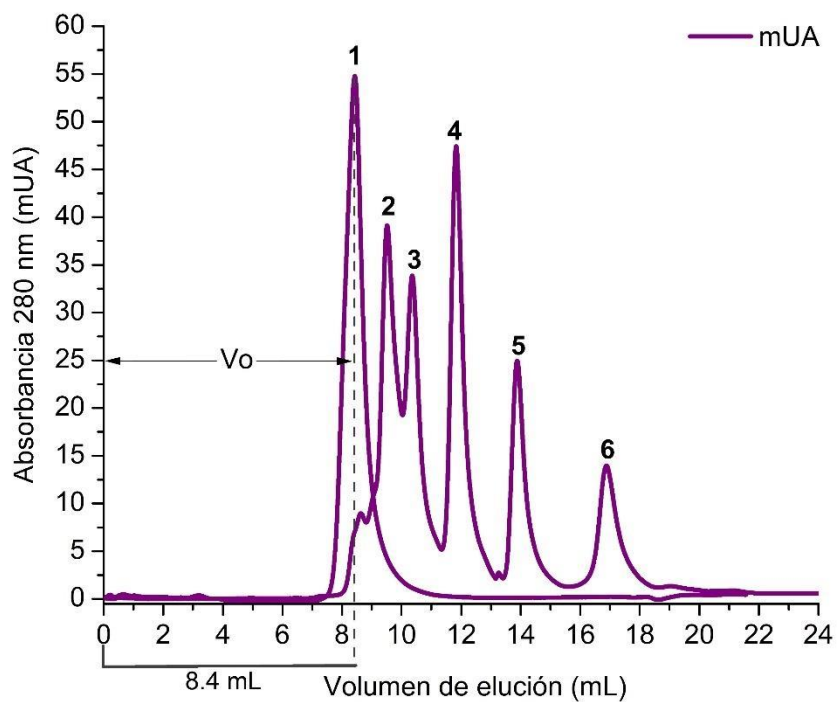


Figura 36. Cromatograma de SEC con el perfil de elución de los estándares de peso molecular aplicados a la Superdex 75 Increase. Se indica el volumen vacío (V_o). La tabla insertada resume las proteínas usadas, su peso molecular y su volumen de elución (V_e).

Tabla 6. Estándares usados para la calibración de la columna Superdex 75.

Pico	Proteína	kDa	Volumen de elución
2	Conalbúmina	75	9.5
3	Ovoalbúmina	43	10.3
4	Anhidrasa carbónica	29	11.8
5	Ribonucleasa A	13.7	13.8
6	Aprotinina	6.5	16.8

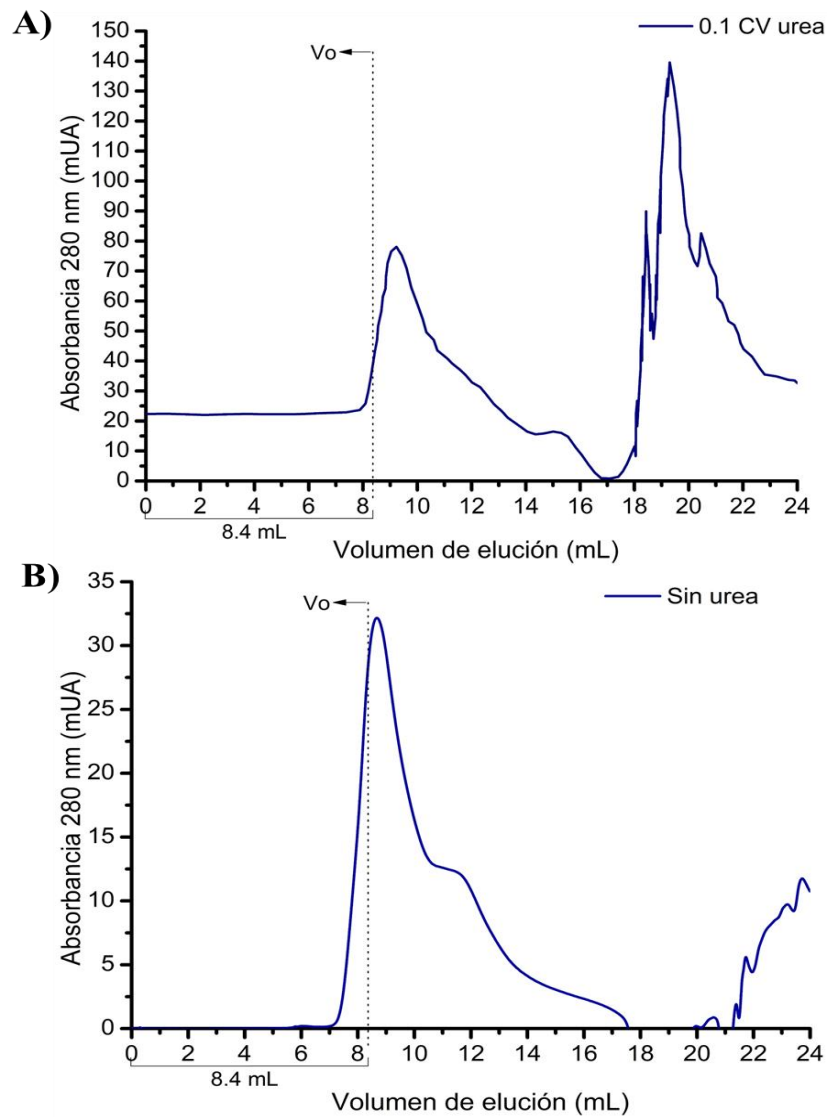


Figura 37. Cromatogramas del efecto del gradiente de urea antes de la inyección de la muestra a la columna de SEC. A) empleando 0.1 CV de urea y B) se omitió el uso de urea.

Tabla 7. Rendimiento de purificación de ED β ₁ por 1 L de cultivo de *E. coli* procesado. El peso húmedo inicial fue de 2.5 g de biomasa.

Paso de purificación	Volumen total (mL)	Concentración (mg/ml)	Proteína total (mg)
IBs	35	0.85	29.65
Replegamiento en SEC:			
Sector I y II	35	0.35	12.35
Sector III	35	0.28	9.67

6.3. Caracterización fisicoquímica del ED β ₁

Para obtener información sobre los parámetros hidrodinámicos relacionados con el tamaño del ED β ₁, primero se retomaron los datos obtenidos con la calibración de la columna de SEC (**Figura 36**, **Tabla 6**) para calcular los valores del coeficiente de distribución (K_{av} , ecuación 1) considerando su parámetro de volumen de elución, así mismo, se calculó el radio Stokes con la ecuación 2 de cada una de las proteínas estándar. En la **Figura 38** se muestra la curva de calibración de la columna SEC del K_{av} vs. R_s de los estándares. Para calcular el R_s del ED β ₁ de la sección III del perfil de elución se consideró su V_e (10.66 mL) y su peso molecular de 39.9 kDa, el valor calculado fue de 28.7 Å (2.87 nm). Dado que en los sectores I y II se observaron bandas de mayor peso molecular del ED β ₁ en el gel SDS-PAGE ya no se continuo con ellas. Posteriormente, se midió por DLS la sección III del replegamiento, la **Figura 39** muestra la distribución de tamaño por la intensidad del ED β ₁ replegado; la muestra medida mostró distribuciones monodispersas con una moda de 3.0 ± 0.5 y 15.5 ± 2.1 nm, las cuales presentaron una distribución de masa de 99.9 % y 0.1 % (**Figura 40**), respectivamente. En paralelo se analizó el ED β ₁ purificado por Ni²⁺-IMAC, los resultados muestran que la r_H de la proteína desplegada es mayor, la moda de las distribuciones fue 5.6 ± 0.6 y 20.4 ± 2.6 nm (línea con triángulos, **Figura 39**), para este caso tienen una distribución por masa del 99.1 % y del 0.9 %, respetivamente. Informes anteriores ya han establecido que la dimensión hidrodinámica de una proteína aumenta en condiciones de desnaturalización (Gast & Modler, 2008; Yu *et al.*, 2013), por lo que la disminución del r_H después del replegamiento del ED β ₁ de 5.6 ± 0.6 nm hasta 3.0 ± 0.5 nm se puede atribuir al proceso de plegamiento. Con respecto a la distribución de 20.4 ± 2.6 nm (0.9 % en masa) observada en el ED β ₁ solubilizado, esta se puede atribuir a agregados solubles que el proceso de replegamiento por SEC puede separar de la forma plegada. Así mismo, también observamos una

segunda distribución de 15.5 ± 2.1 nm (% en masa 0.1 %) en el $ED\beta_1$ replegado. En DLS se sabe que las partículas más grandes contribuyen a la dispersión total de la intensidad aumentando exponencialmente con el tamaño de la partícula (Yu *et al.*, 2013), por lo que, a pesar de ser un porcentaje bajo llega a contribuir a la intensidad de la dispersión.

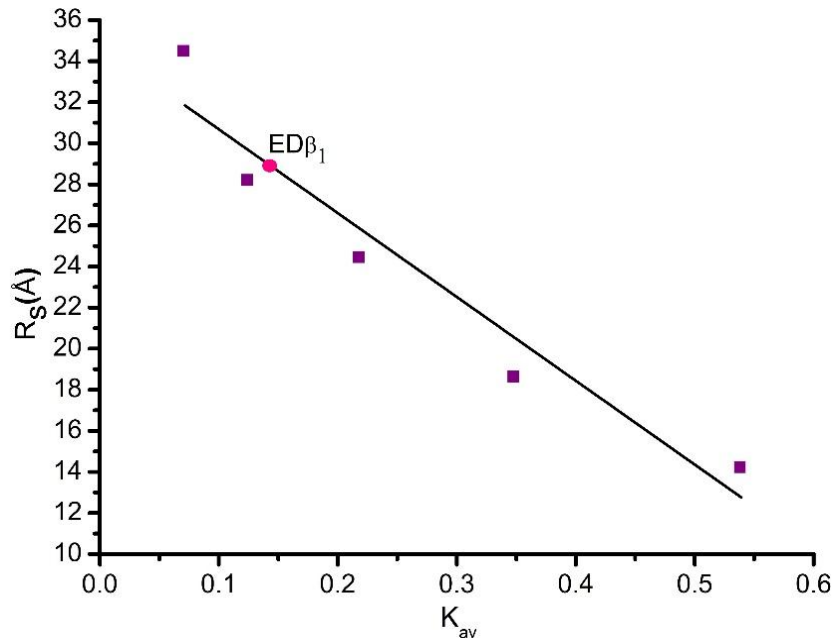


Figura 38. Curva de calibración de la columna Superdex 75. Radio Stokes de los estándares de proteína, los valores del coeficiente de partición (K_{av}) (cuadrados morados) se representan frente a sus correspondientes R_s de los estándares de proteína en el buffer de replegamiento. El círculo rosa indica el $ED\beta_1$ plegado, que tiene un R_s de 28.7 Å.

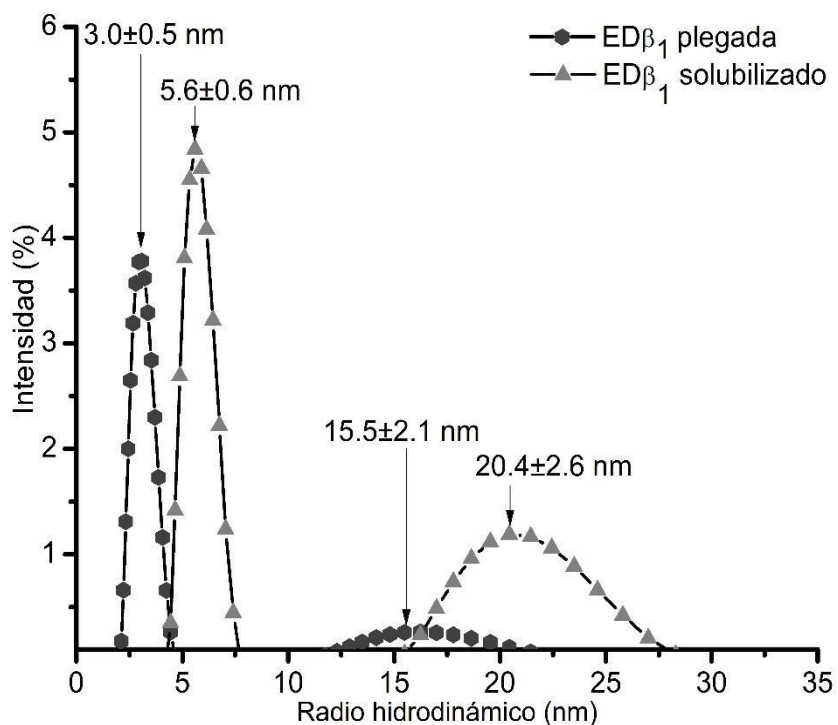


Figura 39. Medición del radio hidrodinámico del ED β_1 por DLS. La proteína plegada en línea con hexágonos y la proteína solubilizada en línea con triángulos.

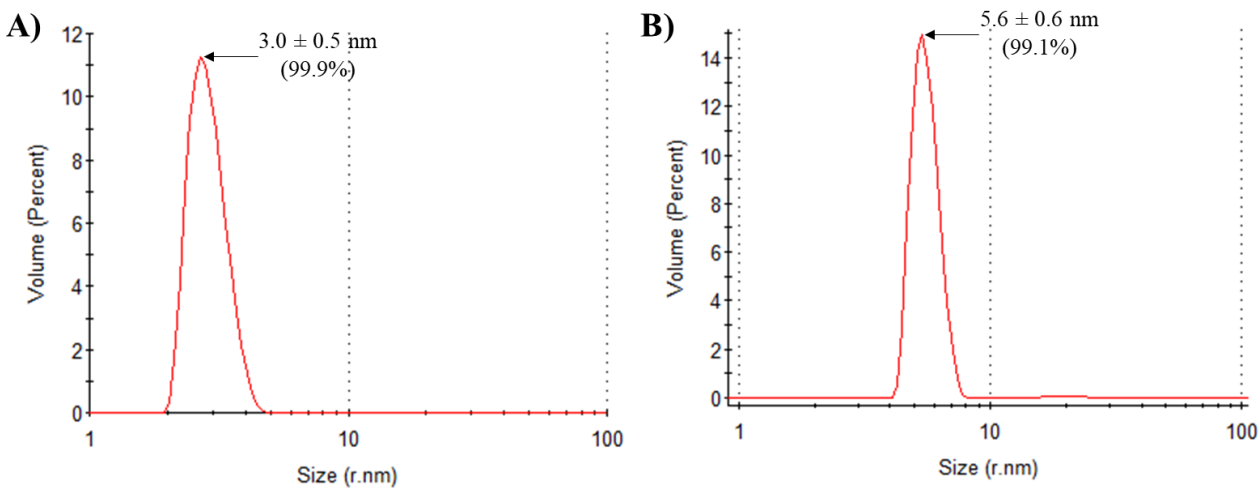


Figura 40. Medición por DLS del radio hidrodinámico del ED β_1 en % de distribución por masa proporcionado por el software del equipo. A) proteína replegado y B) proteína solubilizada en urea.

Para confirmar el estado correctamente plegado de ED β ₁, se analizó el ED β ₁ solubilizado y replegado por espectroscopía Raman en la región característica para la amida I (1600-1700 cm⁻¹) (Dolui *et al.*, 2020; Kurouski, 2017; Oladepo *et al.*, 2012; R. Wang *et al.*, 2020). En un espectro Raman, los cambios ligeros en la posición y la forma del pico de la amida I son usados comúnmente para interpretar la estructura secundaria de las proteínas (Lacidogna *et al.*, 2017). En este contexto, la posición del pico de la amida I depende completamente del esqueleto polipeptídico y de los enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares (Kurouski *et al.*, 2015; Wen, 2007), esto aumenta la señal de varios subpicos directamente relacionados con el tipo de estructura secundaria. Estas señales corresponden en un 80 % a vibraciones de estiramiento C=O y en un 20 % a estiramientos fuera del plano del C-N (Kuhar *et al.*, 2021; Kurouski *et al.*, 2015; Oladepo *et al.*, 2012; C.-H. Wang *et al.*, 2016; R. Wang *et al.*, 2020). Un reporte previo relacionada con la bomba de sodio de la corteza cerebral porcina asignó en el rango de 1620-1670 cm⁻¹ para la amida I (Lacidogna *et al.*, 2017). En la **Figura 41** el espectro Raman en línea continua corresponde a ED β ₁ replegado, en él se observa un pico a 1656 cm⁻¹ (pico 2) correspondiente a la estructura de α -hélice, el rango característico reportado para esta estructura secundaria es de 1650-1660 cm⁻¹) (Dolui *et al.*, 2020; Kuhar *et al.*, 2021; C.-H. Wang *et al.*, 2016; Wen, 2007; Zhou *et al.*, 2015). El pico a 1664 cm⁻¹ (pico 3) se asignó a la estructura de β -hoja (Dolui *et al.*, 2020; Kuhar *et al.*, 2021; Kurouski *et al.*, 2015; Nemecek *et al.*, 2013; Oladepo *et al.*, 2012; C.-H. Wang *et al.*, 2016; R. Wang *et al.*, 2020). La posición de la amida I en la estructura de la β -hoja ha sido reportada en el rango de 1660-1680 cm⁻¹ para diferentes proteínas (Dolui *et al.*, 2020; Kuhar *et al.*, 2021; Kurouski *et al.*, 2015; Nemecek *et al.*, 2013; Oladepo *et al.*, 2012; C.-H. Wang *et al.*, 2016; R. Wang *et al.*, 2020) y está asociada con el enlace de hidrógeno formado entre los grupos C=O y NH de las cadenas adyacentes dispuestas en modo paralelo o antiparalelo. Los picos a 1644 cm⁻¹ (pico 1) y 1685 cm⁻¹ (pico 4) se asignaron a vibraciones características del β -giro/aleatorio (Dolui *et al.*, 2020; Kuhar *et al.*, 2018, 2021; Kurouski *et al.*, 2015; Oladepo *et al.*, 2012; C.-H. Wang *et al.*, 2016; R. Wang *et al.*, 2020; Wen, 2007; Zhou *et al.*, 2015) y a la bobina aleatoria (C.-H. Wang *et al.*, 2016), respectivamente. El espectro Raman del ED β ₁ solubilizado (**Figura 41**, línea de puntos) se observó que los picos son más anchos, los cuales cambian de posición y disminuyen su ancho en el espectro del ED β ₁ replegado. En la **Tabla 8** se resumen las posiciones de los picos observados.

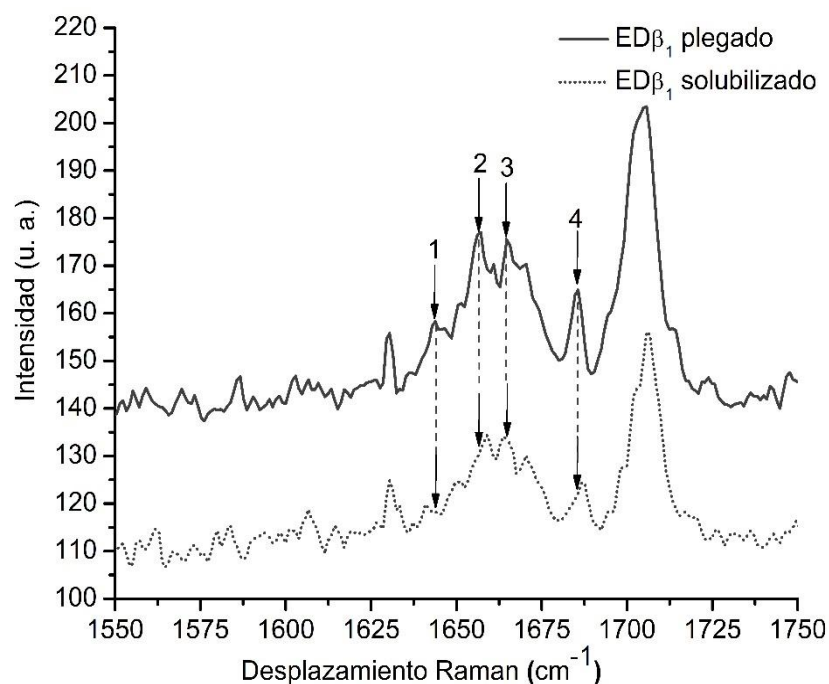


Figura 41. Espectro Raman de $ED\beta_1$ plegado y solubilizado en el rango característica para los modos de vibración de la amida I.

Tabla 8. Asignación de picos de ED_1 plegado en comparación con $ED\beta_1$ solubilizado en la región característica de la amida I.

Pico	Asignación	$ED\beta_1$ solubilizado (cm^{-1})	$ED\beta_1$ plegado (cm^{-1})	Referencia
1	β -giro, aleatoria	-	1644	(Dolui <i>et al.</i> , 2020; Kuhar <i>et al.</i> , 2018, 2021; Kurouski <i>et al.</i> , 2015; Oladepo <i>et al.</i> , 2012; C.-H. Wang <i>et al.</i> , 2016; R. Wang <i>et al.</i> , 2020; Wen, 2007; Zhou <i>et al.</i> , 2015)
2	α -hélice (1650-1660 cm^{-1})	1659	1656	(Dolui <i>et al.</i> , 2020; Kuhar <i>et al.</i> , 2021; C.-H. Wang <i>et al.</i> , 2016; Wen, 2007; Zhou <i>et al.</i> , 2015)
3	β -lámina (1660-1680 cm^{-1})	1663	1664	(Dolui <i>et al.</i> , 2020; Kuhar <i>et al.</i> , 2021; Kurouski <i>et al.</i> , 2015; Nemecek <i>et al.</i> , 2013; Oladepo <i>et al.</i> , 2012; C.-H. Wang <i>et al.</i> , 2016; R. Wang <i>et al.</i> , 2020)
4	Bobina aleatoria	1687	1685	(C.-H. Wang <i>et al.</i> , 2016)

Para estimar el porcentaje de estructura secundaria, se analizó el $ED\beta_1$ replegado por dicroísmo circular. La **Figura 42** muestra el espectro que revela una elipticidad molar negativa, con un mínimo de alrededor de 205 nm. Los datos CD se analizaron utilizando BESTSEL (Micsonai *et al.*, 2021); la

cantidad de elementos estructurales calculada fue 19.0 % de α -hélice, 28.5 % de β -lámina y 52.5 % de giro/otros. Se usó AlphaFold 2 (Jumper *et al.*, 2021) para predecir la estructura del modelo de ED β_1 que expresamos y replegamos en su forma monomérica para compararlos con los resultados de CD, se consideraron los aminoácidos 63-303 (ID de código UniProt: P06583), incluimos la etiqueta 6xHis y el sitio TEV en el extremo N-terminal. En la **Figura 43A**, se muestra la representación del modelo en cinta del monómero ED β_1 . Los valores estimados para el modelo generado por AlphaFold 2 fueron 18.3 % de estructura de α -hélice, 20.7 % de β -hoja y 61.0 % de giro/otros. La estimación de la estructura secundaria también se comparó con el modelo ED β_1 construido en el servidor *SWISS-MODEL* y que fue informado previamente por nuestro grupo de trabajo (**Figura 43B**). Este modelo se construyó por homología utilizando como templado a la estructura cristalina de la NKA de cerdo con una resolución de 2.8 Å (Kanai *et al.*, 2013), la cual tiene una identidad del 92 % con la secuencia de aminoácidos del perro (Páez *et al.*, 2019). En el modelo del ED β_1 de perro se consideró a los aminoácidos 61-303 y se omitió a los oligosacáridos en los sitios de N-glicosilación (Páez *et al.*, 2019). En la **Figura 44C** se muestran los dos modelos superpuestos, en color azul marino el modelo generado por AlphaFold 2 y en rojo en construido en *SWISS-MODEL*. La **Figura 44** se muestran los modelos coloreados por el tipo de estructura secundaria y con diferentes giros para una mejor apreciación del tipo de estructura. En virtud de los resultados comparativos entre los datos experimentales con los modelos, el modelo generado con AlphaFold 2 se ajusta mejor a los datos experimentales. Los resultados comparativos se resumen en la **Tabla 9**. DeepMind, los creadores del algoritmo AlphaFold 2, afirman que su algoritmo puede predecir estructuras de proteínas con una precisión similar a la obtenida con técnicas experimentales, ya que utiliza la secuencia de aminoácidos primaria como entrada y una red neuronal para predecir estructuras de proteínas (Jumper *et al.*, 2021). Agregando a los resultados, el modelo generado en AlphaFold 2 se usó como referencia para complementar el análisis del ED β_1 replegado, el modelo presentó dimensiones de 6.5 × 6.9 × 4.7 nm. También está disponible el modelo de la subunidad β_1 que incluye su dominio citoplasmático y su segmento transmembrana y se puede consultar con el código *UniProt* en *AlphaFold Protein Structure Database* (<https://AlphaFold.ebi.ac.uk/>). En paralelo se realizaron las mediciones del ED β_1 de la sección I cromatográfica, la medición se presenta en la **Figura 45**, de igual forma se realizó la estimación del % de estructura secundaria. El número de elementos estructurales calculados fue 0.0 % α -hélice, 29.4 % β -hoja y 70.6 % de giros/otros. Es importante considerar que esta muestra tenía una población de proteínas heterogenia que incluída diferentes oligómeros que se apreciaron en

el gel SDS-PAGE, por lo tanto, se tenía la contribución en la elasticidad de todos esos estados incluidos los que no se plegaron con una estructura similar a la nativa de la proteína de interés. Por otro lado, no se consideraron las mediciones la proteína solubilizada debido a la alta concentración de urea (8 M) presente en el *buffer* A (sección 5.2.3.), ya que se produce un proceso de absorbanza que impide medir una señal de dicroísmo en longitudes de onda cortas (<210 nm). Por lo tanto, las altas concentraciones de agentes caotrópicos impiden los estudios estructurales mediante espectroscopia de CD (Miles & Wallace, 2016).

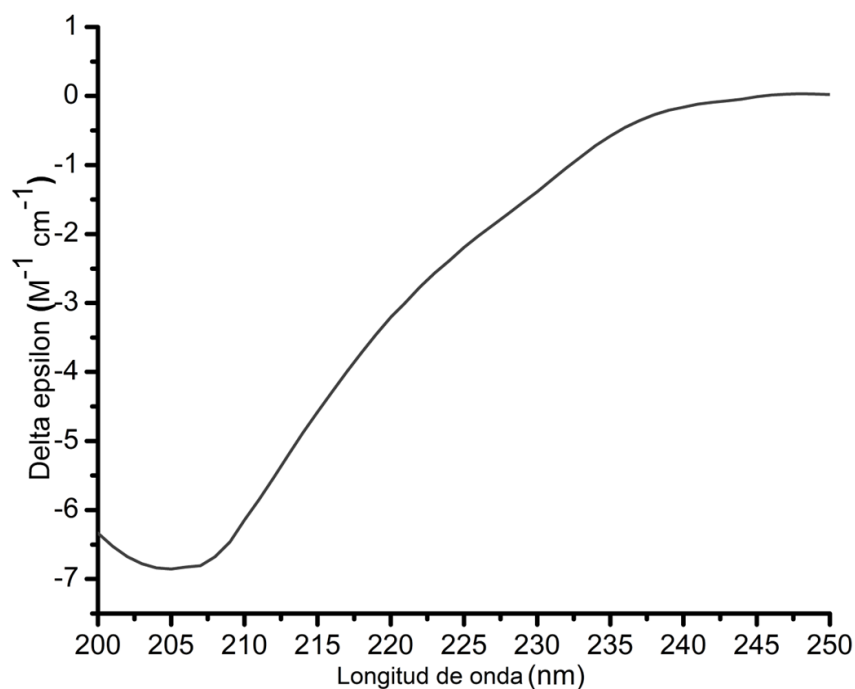


Figura 42. Determinación de la estructura secundaria de EDβ₁ recombinante de la sección II del replegamiento.

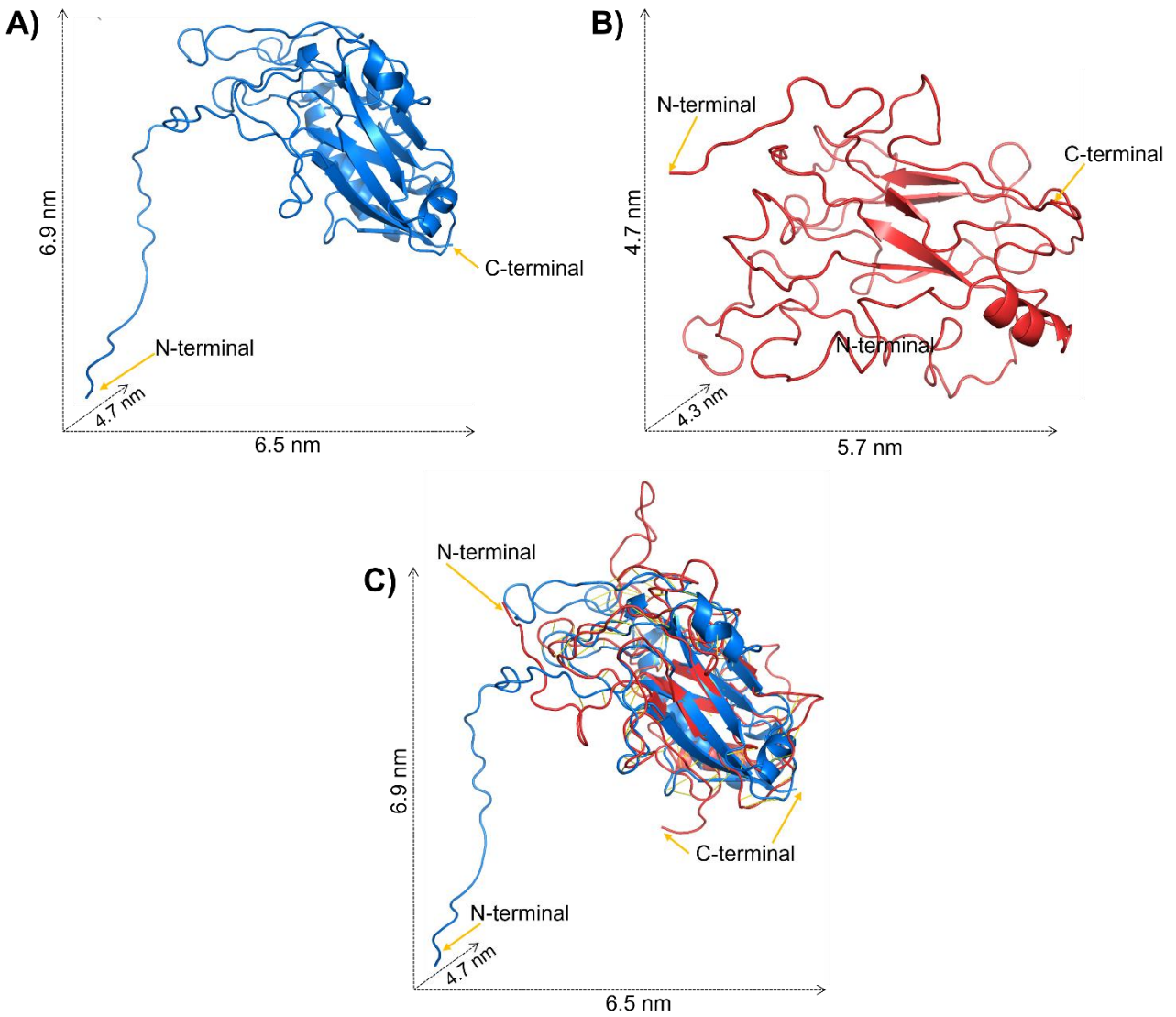


Figura 43. Modelos del ED β_1 representados en cinta. A) modelo predicho en AlphaFold2, B) modelo construido en SWISS-MODEL reportado por Páez et al. (2019) y C) superposición de ambos modelos. Se indica el C-terminal y N-terminal, así como sus dimensiones calculadas en el software PyMol.

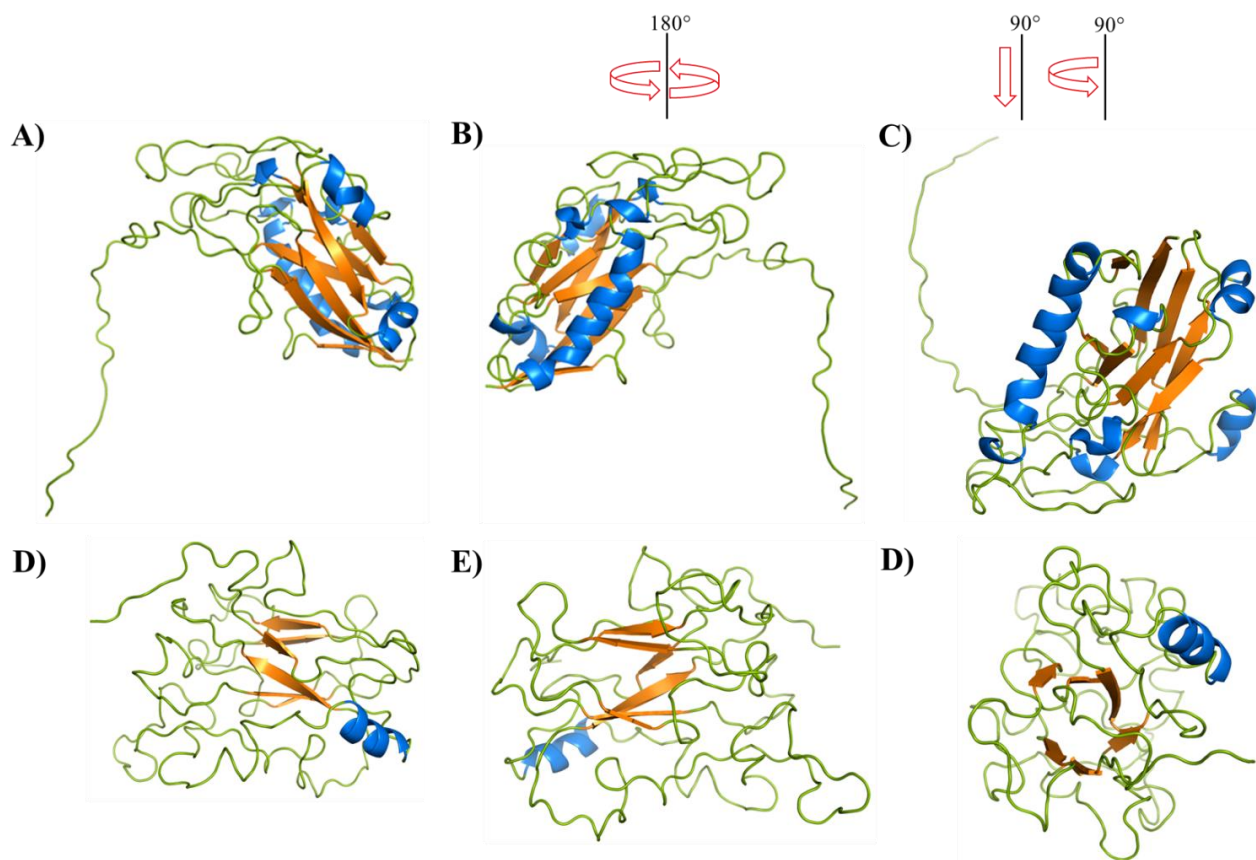


Figura 44. Modelos en cinta del $ED\beta_1$ coloreados por el tipo de estructura secundaria, el color azul marino corresponde a la estructura α -hélice, la β -hoja se resalta en color naranja y los loops (otros) en color verde. A), B) y C) son el modelo predicho en AlphaFold2. D), E) y F) son el modelo predicho en SWISS-MODEL reportado por Páez et al. (2019). Para una mejor apreciación se muestran los modelos con giros de 180° y 90° respecto al eje y.

Tabla 9. Estimación de la estructura secundaria obtenida a partir de la CD del $ED\beta_1$ plegado en comparación con el % de estructura secundaria del modelo predicho en AlphaFold 2 y lo reportado previamente por Páez et al.

Tipo de estructura	Datos experimentales (CD $ED\beta_1$)	Modelo de AphaFold 2	Modelo por homología (Páez et al., 2019)
β -lamina	28.5 %	20.7 %	13.2 %
α -hélice	19.0 %	18.3 %	7.4 %
Giro/otros	52.5 %	61.0 %	79.4 %

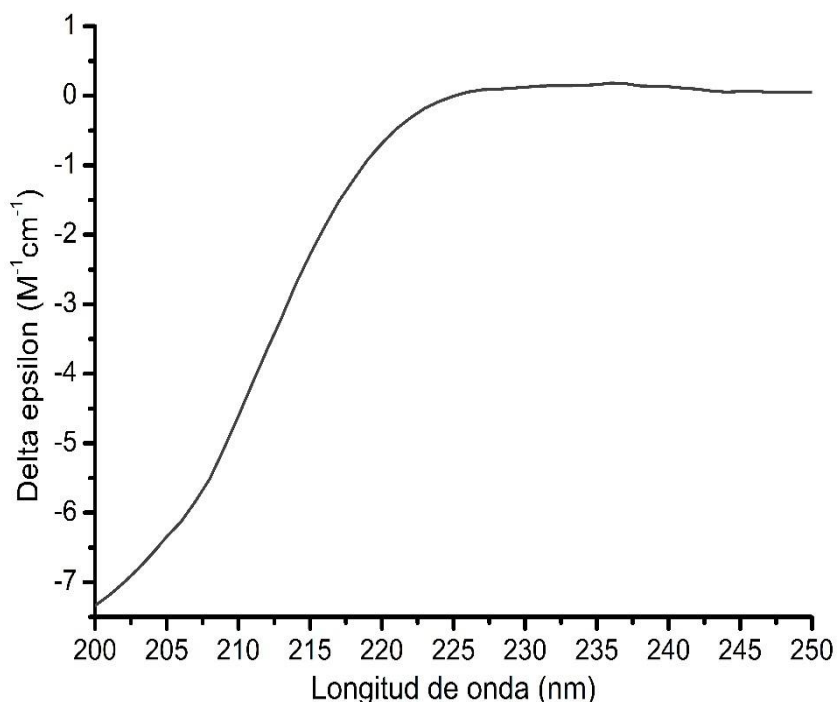


Figura 45. Determinación de la estructura secundaria de ED β_1 recombinante de la sección I del repliegamiento.

Con base a los estudios de mutagénesis dirigida y a los análisis *in silico* se ha propuesto una interfaz de interacción entre las subunidades β_1 (Páez *et al.*, 2019). Dentro de este mismo reporte se menciona que el dominio extracelular es una estructura estable y permanece plegada independientemente del resto de la bomba, también mencionan que la mitad C-terminal del dominio extracelular es más estable que la mitad N-terminal, y es en esta región donde dos subunidades β_1 interactúan para formar un dímero en la posición *trans* (Páez *et al.*, 2019). Además, informes anteriores han demostrado que la versión soluble de ED β_1 tiene propiedades adhesivas (Padilla-Benavides *et al.*, 2010). Nuestros resultados confirmaron que el ectodominio de la subunidad β_1 es una estructura estable que permanece plegada independientemente del resto de la Na⁺, K⁺-ATPasa.

6.4. Interacción β_1 - β_1 del ED β_1 replegado

Para el ensayo de interacción β_1 - β_1 , se utilizó el ED β_1 replegado en dos versiones, una que incluye la etiqueta de histidina (6xHis β_1) y otra sin la etiqueta de histidina (β_1). Entre ambas versiones se esperaba una pequeña diferencia de peso molecular (~ 2 kDa), ya que la versión β_1 no tenía presente los aminoácidos HHHHHHSSGENLYFQ que corresponden a la etiqueta de 6xHis, una pequeña secuencia de unión entre la etiqueta y el sitio TEV, y el sitio TEV. La **Figura 46A** corresponde al perfil de elución de la prueba de interacción; se indican los sectores cromatográficos (I, II, III y IV). El dímero 6xHis β_1 - β_1 formado se eluyó a una concentración de imidazol de 153-215 mM (sector III). En la fase no unida (sector I y II), observamos la proteína que no interactuaba (β_1) y no se unía a la columna. En el gradiente lineal, también observamos un segundo pico (sector IV) que eluyó a una concentración de imidazol de 283-337 mM; este sector IV corresponde a 6xHis β_1 que no formó complejos, pero sí se unió a la columna (Ni²⁺-IMAC). Las fracciones recolectadas se analizaron primero por SDS-PAGE (**Figura 46B**). En la fase libre (carriles I y II) se observó una banda que corresponde a β_1 (28.4 kDa), el carril III corresponde al sector III eluido en el gradiente de imidazol, así mismo, se apreciaron dos bandas que corresponden a 6xHis β_1 (30.4 kDa) y β_1 . El carril IV es igual a 6xHis β_1 del sector IV observado en el perfil de elución. La **Figura 46C** es el análisis mediante Western blot; como se esperaba, el anticuerpo contra la subunidad β_1 de NKA detectó las bandas de 30.4 y 28.4 kDa (carriles I, II, III y IV, panel superior **Figura 46C**). Con el anticuerpo contra histidina, solo se detectó 6xHis β_1 (carriles III y IV, panel inferior **Figura 46C**). Con respecto al control positivo, observamos que 6xHis β_1 eluyó a una concentración de imidazol de 277-394 mM (**Figura 47A**), que fue una concentración similar a la que observamos en el perfil de elución de la **Figura 47A**. Cuando se trató β_1 (control negativo) en Ni²⁺-IMAC, la proteína no se unió a la columna de afinidad (**Figura 47B**).

Los resultados del ensayo de interacción indican que la ED β_1 recombinante en *E. coli* puede formar dímeros (6xHis β_1 - β_1) (**Figura 46A**). Estudios previos en nuestro laboratorio informaron sobre la interacción *in vitro* β_1 - β_1 con ensayos de inmunoprecipitación y *pull-down* utilizando la subunidad β_1 de perro de tipo salvaje, el ED β_1 y la subunidad β_1 de perro completa con una etiqueta de 6xHis, estas dos últimas versiones expresados en células CHO (Padilla-Benavides *et al.*, 2010). En el presente trabajo, el ED β_1 recombinante no presenta los oligosacáridos correspondientes en sus sitios de N-glicosilación. Se ha informado que los N-glicanos no son necesarios para el plegamiento adecuado

de la subunidad β_1 (Tokhtaeva *et al.*, 2009), los resultados del presente trabajo sugieren que ED β_1 puede expresarse y replegarse sin los oligosacáridos correspondientes. Es importante mencionar que ya se ha reportado que la subunidad β_1 no N-glicosilada da como resultado una formación más lenta de contactos célula-célula (Vagin *et al.*, 2006). Por otro lado, el desarrollo normal de la adhesión célula-célula se ha asociado con una complejidad reducida de los N-glicanos de la subunidad β_1 de NKA y otras proteínas de adhesión. Se demostró que la prevención de la ramificación de los glicanos en la subunidad β_1 fortalece y estabiliza las uniones célula-célula. Por el contrario, un aumento en la ramificación de N-glicanos hace más débiles los contactos célula-célula (Vagin *et al.*, 2008). En el modelo de interacción β_1 - β_1 reportado por nuestro grupo de investigación no incluyó N-glicanos, pero se identificó a la Asn193 como el residuo N-glicosilado más cercano a la interfaz propuesta, postulándolo como el residuo que más contribuye al proceso de unión (Páez *et al.*, 2019). La formación de dímeros (6xHis β_1 - β_1) que reportamos en este trabajo puede darnos información sobre qué tan importante es Asn193 para estabilizar la unión entre las subunidades β_1 , además, de verificar la interfaz de interacción propuesta por trabajos previos.

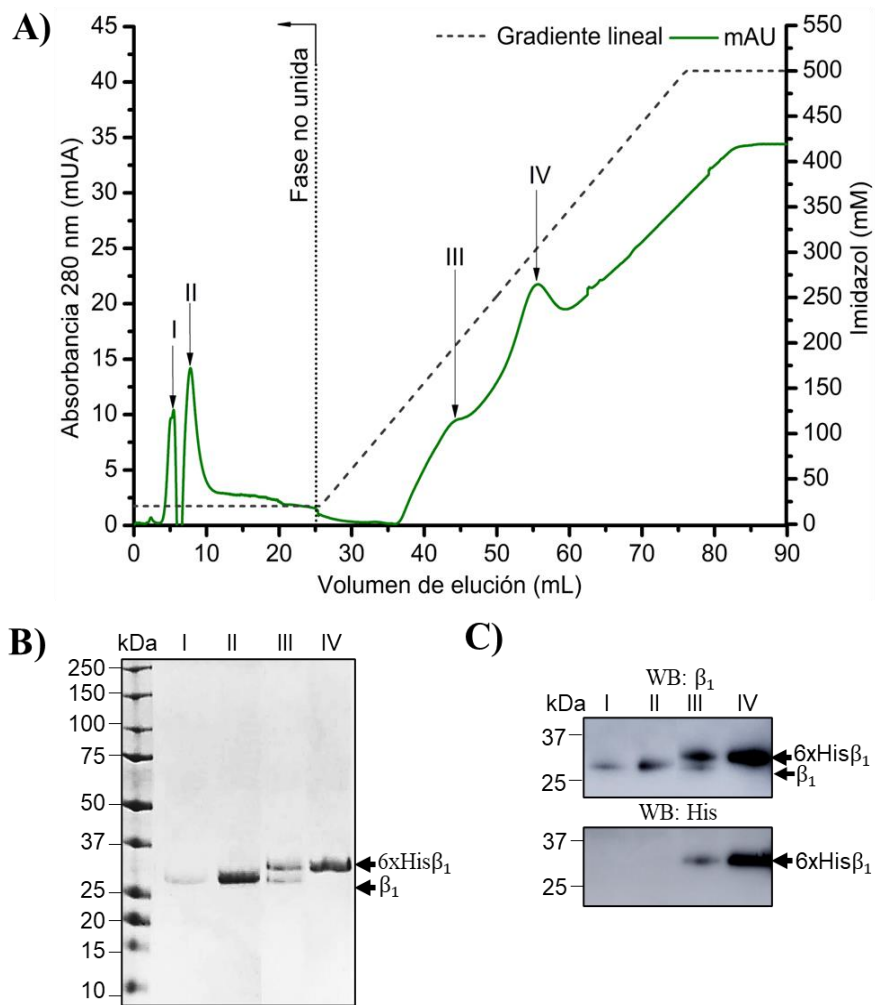


Figura 46. Ensayo de interacción β_1 - β_1 . A) Perfil de elución del ensayo de interacción $6xHis\beta_1$ - β_1 utilizando el $ED\beta_1$ plegado. La fase no unida y el gradiente de imidazol lineal son indicados. El perfil tiene los sectores I, II, III y IV. B) SDS-PAGE de las fracciones recolectadas que muestra las bandas $6xHis\beta_1$ (30,4 kDa) y β_1 (28,4 kDa). C) Western blot (WB) del perfil de elución. En el panel superior (WB: β_1) se utilizó el anticuerpo monoclonal contra la subunidad β_1 de NKA, y en el panel inferior (WB: His) se usó el anticuerpo contra la histidina.

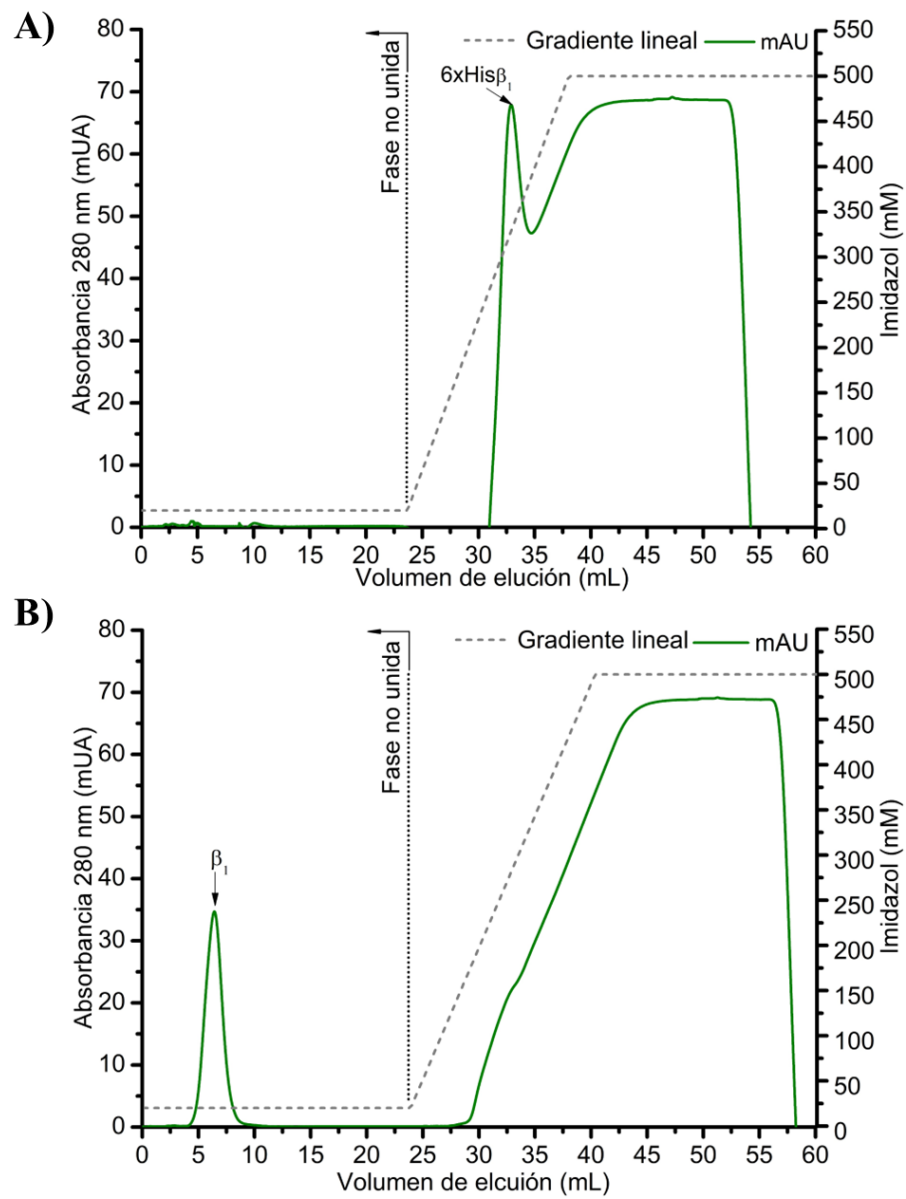


Figura 47. Controles en el ensayo de interacción β_1 - β_1 . A) perfil de elución del control positivo (6xHis β_1) y B) perfil de elución del control negativo (β_1).

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- De los cuatro vectores obtenidos para expresar al ED β_1 , se continuó con el vector pCri-8a-ED β_1 dado que fue más conveniente replegar al ED β_1 desde IBs cuando la proteína solo tiene en el extremo N-terminal una etiqueta de 6xHis, en contraste a cuando está unida a una proteína de unión de mayor tamaño, ya que el ED β_1 se vuelve inestable en solución después de la proteólisis con la enzima TEV.
- Se estableció un protocolo purificación y replegamiento en SEC para el dominio extracelular de la subunidad β_1 . Se observó la importancia de un buen procedimiento de aislamiento de cuerpos de inclusión por homogeneización, el procedimiento permitió obtener IBs de morfología esférica con un radio hidrodinámico de 18.9 ± 3.0 nm y 265.5 ± 37.5 nm. Además, de la importancia de incluir un gradiente de 0.2 CV de urea antes de la iniciar a replegamiento de la proteína, así mismo, el uso de *buffer* de replegamiento que incluya un sistema redox y L-arginina.
- En conjunto, nuestros resultados proporcionan una fuerte evidencia de que el dominio extracelular de la subunidad β_1 recombinante de la NKA canina expresada en *E. coli* cepa Rosetta (DE3), purificada y replegada a partir de cuerpos de inclusión exhibe los modos vibratorios característicos de la amida I en las diferentes estructuras secundarias. Igualmente, la estimación de la estructura secundaria es muy parecida al modelo predicho por AlphaFold 2. Además, la proteína que obtuvimos tiene una función biológica similar a la nativa, según el ensayo de interacción que realizamos.

PERSPECTIVAS

El trabajo actual en nuestro laboratorio tiene como objetivo caracterizar a nivel atómico la interfaz de interacción entre las subunidades β_1 de Na^+ , K^+ -ATPasa, por lo que aún es necesario abordar varias cuestiones experimentales para proceder al análisis estructural.

- El procedimiento para el aislamiento de IBs se podría optimizar para solo obtener una sola distribución de tamaño mediante filtración tangencial y analizar su efecto en la solubilización y posteriormente en el replegamiento del $\text{ED}\beta_1$.
- Para complementar a mayor detalle los modos vibracionales de la proteína analizar la región de la amida III mediante espectroscopia infrarroja y Raman.
- La formación de dímeros ($6\text{xHis}\beta_1$ - β_1) que reportamos en este trabajo puede darnos información sobre qué tan importante es Asn193 para estabilizar la unión entre las subunidades β_1 , para ello es necesario realizar más pruebas de interacción a diferentes concentraciones de proteínas, realizar el replegamiento con dos las dos versiones de la proteína ($6\text{xHis}\beta_1$ y β_1), y cuantificar la formación de dímeros.
- Formar un cristal de los dímeros de la subunidad β_1 con la calidad necesaria para su análisis por difracción de rayos X y proponer un modelo de interacción β_1 - β_1 .

BIBLIOGRAFÍA

Abe, R., Kudou, M., Tanaka, Y., Arakawa, T., & Tsumoto, K. (2009). Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(3), 306–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.054>

Almeida, J. G., Preto, A. J., Koukos, P. I., Bonvin, A. M. J. J., & Moreira, I. S. (2017). Membrane proteins structures: A review on computational modeling tools. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1859(10), 2021–2039. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.07.008>

Arakawa, T., & Tsumoto, K. (2003). The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: Not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(1), 148–152. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00578-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00578-3)

Axelsen, K. B., & Palmgren, M. G. (2001). Inventory of the Superfamily of P-Type Ion Pumps in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 126, 696–706. www.plantphysiol.org

Bajorunaite, E., Sereikaite, J., & Bumelis, V.-A. (2007). l-Arginine Suppresses Aggregation of Recombinant Growth Hormones in Refolding Process from E. coli Inclusion Bodies. *The Protein Journal*, 26(8), 547–555. <https://doi.org/10.1007/s10930-007-9096-x>

Bejcek, J., Spiwork, V., Kmoníčková, E., & Rimpelová, S. (2021). Na⁺/K⁺-ATPase Revisited: On Its Mechanism of Action, Role in Cancer, and Activity Modulation. *Molecules*, 26, 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules26071905>

Campbell, H. K., Maiers, J. L., & DeMali, K. A. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Experimental Cell Research*, 358(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.061>

Campos, L. A. (2022). Protein Folding. In V. Muñoz (Ed.), *Biotechnology* (Vol. 2376). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1716-8>

Caplan, M. J., Anderson, H. C., Palade, G. E., & Jamieson, J. D. (1986). Intracellular sorting and polarized cell surface delivery of (Na⁺, K⁺)ATPase, an endogenous component of MDCK cell basolateral plasma membranes. *Cell*, 46(4), 623–631. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90888-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90888-3)

Cereijido, M., Ehrenfeld, J., Meza, I., & Martinez-palomo, A. (1980). Membrane Biology Structural and Functional Membrane Polarity in Cultured Monolayers of MDCK Cells. *The Journal of Membrane Biology*, 159, 147–159.

Cereijido, M., Larre, I., Paez, O., & Shoshani, L. (2016). Ion Channels and Transporters of Epithelia in Health and Disease. In K. L. Hamilton & D. C. Devor (Eds.), *Ion Channels and Transporters of Epithelia in Health and Disease*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3366-2>

Cereijido, M., Shoshani, L., & Contreras, R. (2001). The polarized distribution of Na⁺, K⁺-ATPase and active transport across epithelia. *Journal of Membrane Biology*, 184(3), 299–304. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0097-y>

Choi, S. L., Lee, S. J., Yeom, S. J., Kim, H. J., Rhee, Y. H., Jung, H. C., & Lee, S. G. (2014). Controlled localization of functionally active proteins to inclusion bodies using leucine zippers. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097093>

Cohen, E., Goldshleger, R., Shainskaya, A., Tal, D. M., Ebel, C., Le Maire, M., & Karlisch, S. J. D. (2005). Purification of Na⁺, K⁺-ATPase expressed in *Pichia pastoris* reveals an essential role of phospholipid-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 16610–16618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414290200>

Contreras, R. G., Lázaro, A., Flores-Maldonado, C., Sánchez, S. H., González-Mariscal, M. R., García-Villegas, J., & Cereijido, M. (1995). Membrane Biology A Novel Type of Cell-Cell Cooperation Between Epithelial Cells. *The Journal of Membrane Biology*, 310, 305–310.

Curnow, P. (2009). Membrane proteins in nanotechnology. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 643–652. <https://doi.org/10.1042/BST0370643>

Curtis-Fisk, J., Spencer, R. M., & Weliky, D. P. (2008). Native Conformation at Specific Residues in Recombinant Inclusion Body Protein in Whole Cells Determined with Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12568–12569.

de Groot, N. S., & Ventura, S. (2006). Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters*, 580(27), 6471–6476. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.071>

de la Cruz, J. J., Villanueva-Lizama, L., Dzul-Huchim, V., Ramírez-Sierra, M. J., Martínez-Vega, P., Rosado-Vallado, M., Ortega-Lopez, J., Flores-Pucheta, C. I., Gillespie, P., Zhan, B., Bottazzi, M. E., Hotez, P. J., & Dumonteil, E. (2019). Production of recombinant TSA-1 and evaluation of its potential for the immuno-therapeutic control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *15*(1), 210–219. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1520581>

Dilworth, M. V., Piel, M. S., Bettaney, K. E., Ma, P., Luo, J., Sharples, D., Poyner, D. R., Gross, S. R., Moncoq, K., Henderson, P. J. F., Miroux, B., & Bill, R. M. (2018). Microbial expression systems for membrane proteins. *Methods*, *147*, 3–39. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.04.009>

Dolui, S., Mondal, A., Roy, A., Pal, U., Das, S., Saha, A., & Maiti, N. C. (2020). Order, Disorder, and Reorder State of Lysozyme: Aggregation Mechanism by Raman Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, *124*(1), 50–60. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09139>

Ellis, R. J. (2006). Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends in Biochemical Sciences*, *31*(7), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.05.001>

Frauenfelder, H. (2010). The Physics of Proteins. In S. S. Chan & W. S. Chan (Eds.), *Media*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1044-8>

Gast, K., & Modler, A. J. (2008). Studying Protein Folding and Aggregation by Laser Light Scattering. In *Protein Folding Handbook* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1002/9783527619498.ch19>

Gazit, E., & Mitraki, A. (2013). Plenty of Room for Biology at the Bottom. In *Plenty of Room for Biology at the Bottom*. <https://doi.org/10.1142/p862>

Geering, Kaethi. (2008). Functional roles of Na⁺, K⁺-ATPase subunits. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, *17*, 526–532.

Geering, Käthi. (2001). The functional role of β subunits in oligomeric P-type ATPases. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *33*(5), 425–438. [https://doi.org/0145-479X/01/1000-0425\\$19.50/0](https://doi.org/0145-479X/01/1000-0425$19.50/0)

Gloor, S., Antonicek, H., Sweadner, K. J., Pagliusi, S., Frank, R., Moos, M., & Schachner, M. (1990). *The Adhesion Molecule on Glia (AMOG) Is a Homologue of the B Subunit of the Na,K-ATPase*. *110*(January), 165–174.

Gomes, C. M., & Faísca, P. F. N. (2019). *Protein Folding*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-00882-0>

Goulas, T., Cuppari, A., Garcia-Castellanos, R., Snipas, S., Glockshuber, R., Arolas, J. L., & Gomis-Rüth, F. X. (2014). The pCri system: A vector collection for recombinant protein expression and purification. *PLoS ONE*, *9*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112643>

Gu, Z., Su, Z., & Janson, J. C. (2001). Urea gradient size-exclusion chromatography enhanced the yield of lysozyme refolding. *Journal of Chromatography A*, *918*(2), 311–318. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00766-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00766-X)

Gu, Z., Zhu, X., Ni, S., Su, Z., & Zhou, H. (2004). Conformational changes of lysozyme refolding intermediates and implications for aggregation and renaturation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *36*(5), 795–805. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.015>

Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1778*, 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>

Herman, P., & Lee, J. C. (2021). Allostery. In L. Di Paola & A. Giuliani (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2253). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1154-8>

Huynh, T. P., Barwe, S. P., Lee, S. J., McSpadden, R., Franco, O. E., Hayward, S. W., Damoiseaux, R., Grubbs, S. S., Petrelli, N. J., & Rajasekaran, A. K. (2015). Glucocorticoids suppress renal cell carcinoma progression by enhancing Na, K-ATPase beta-1 subunit expression. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122442>

- Jachimska, B., Wasilewska, M., & Adamczyk, Z. (2008). Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. *Langmuir*, *24*(13), 6867–6872. <https://doi.org/10.1021/la800548p>
- Jørgensen, P. L. (1986). Structure, function and regulation of Na⁺, K⁺-ATPase in the kidney. *Kidney International*, *29*, 10–20. <https://doi.org/10.1038/ki.1986.3>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*, 583. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kanai, R., Flemming, C., Vilsen, B., & Toyoshima, C. (2022). Cryoelectron microscopy of Na⁺, K⁺-ATPase in the two E2P states with and without cardiotonic steroids. *Biochemistry*, *119*, 1–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.2123226119>
- Kanai, R., Ogawa, H., Vilsen, B., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2013). Crystal structure of a Na-bound Na⁺, K⁺-ATPase preceding the E1P state. *Nature*, *502*(7470), 201–206. <https://doi.org/10.1038/nature12578>
- Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.*, *71*, 511–532. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218>
- Kato, A., & Ohashi, H. (2021). Quick Refolding of High-Concentration Proteins via Microchannel Dialysis. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *60*(28), 10076–10082. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c00410>
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, *106*, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kolb, A. R., Buck, T. M., & Brodsky, J. L. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model system for kidney disease: What can yeast tell us about renal function? *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *301*(1). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00141.2011>

Krachmarova, E., Ivanov, I., & Nacheva, G. (2020). Nucleic acids in inclusion bodies obtained from *E. coli* cells expressing human interferon - gamma. *Microbial Cell Factories*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01400-6>

Kudou, M., Okazaki, F., Asai-Nakashima, N., Ogino, C., & Kondo, A. (2015). Expression of cold-adapted β -1,3-xylanase as a fusion protein with a ProS2 tag and purification using immobilized metal affinity chromatography with a high concentration of ArgHCl. *Biotechnology Letters*, 37(1), 89–94. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1666-3>

Kuhar, N., Sil, S., & Umapathy, S. (2021). Potential of Raman spectroscopic techniques to study proteins. In *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (258). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119712>

Kuhar, N., Sil, S., Verma, T., & Umapathy, S. (2018). Challenges in application of Raman spectroscopy to biology and materials. *RSC Advances*, 8(46), 25888–25908. <https://doi.org/10.1039/C8RA04491K>

Kurouski, D. (2017). Advances of tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) in electrochemistry, biochemistry, and surface science. *Vibrational Spectroscopy*, 91, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.06.004>

Kurouski, D., Van Duyne, R. P., & Lednev, I. K. (2015). Exploring the structure and formation mechanism of amyloid fibrils by Raman spectroscopy: A review. *Analyst*, 140(15), 4967–4980. <https://doi.org/10.1039/c5an00342c>

Kwon, S., Yu, J., Kim, J., Oh, H., Park, C., Lee, J., & Seong, B. (2019). Quality Screening of Incorrectly Folded Soluble Aggregates from Functional Recombinant Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 907. <https://doi.org/10.3390/ijms20040907>

Lacidogna, G., Piana, G., Bassani, A., & Carpinteri, A. (2017). Raman spectroscopy of Na/K-ATPase with special focus on low-frequency vibrations. *Vibrational Spectroscopy*, 92, 298–301. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.08.002>

Lartey, N. L., Valle-Reyes, S., Vargas-Robles, H., Jiménez-Camacho, K. E., Guerrero-Fonseca, I. M., Castellanos-Martínez, R., Montoya-García, A., García-Cordero, J., Cedillo-Barrón, L., Nava, P., Filisola-Villaseñor, J. G., Roa-Velázquez, D., Zavala-Vargas, D. I., Morales-Ríos, E., Salinas-Lara, C., Vadillo, E., & Schnoor, M. (2021). ADAM17/MMP inhibition prevents neutrophilia and lung injury in a mouse model of COVID-19. *Journal of Leukocyte Biology*, April, 1–12. <https://doi.org/10.1002/JLB.3COVA0421-195RR>

Laursen, M., Yatime, L., Nissen, P., & Fedosova, N. U. (2013). Crystal structure of the high-affinity Na⁺, K⁺-ATPase–ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27), 10958–10963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222308110>

Lebendiker, M., & Danieli, T. (2014). Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS Letters*, 588(2), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.044>

Lee, Y. C., & Moon, J. Y. (2020). Introduction to bionanotechnology. In *Introduction to Bionanotechnology*. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1293-3>

Lobato-Álvarez, J. A., López-Murillo, T. del C., Vilchis-Nestor, C. A., Roldán Gutierrez, M. L., Páez-Gómez, O., & Shoshani, L. (2016). Epithelial Na⁺,K⁺-ATPase - A Sticky Pump. *Cell Biology - New Insights*, 2016, 29–57. <https://doi.org/10.5772/61244>

Lorber, B., de rick Fischer, F., Bailly, M., Roy, H., & Kern, D. (2012). Protein Analysis by Dynamic Light Scattering: Methods and Techniques for Students. *The International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 372–382. <https://doi.org/10.1002/bmb.20644>

Lubarski-Gotliv, I., Dey, K., Kuznetsov, Y., Kalchenco, V., Asher, C., & Garty, H. (2017). FXVD5 (Dysadherin) may mediate metastatic progression through regulation of the β-Na⁺-K⁺-ATPase subunit in the 4T1 mouse breast cancer model. *American Journal of Physiology Cell Physiology Cell Physiology*, 313(1), 108–117. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00206.2016>

Margreiter, G., Schwanninger, M., Bayer, K., & Obinger, C. (2008). Impact of different cultivation and induction regimes on the structure of cytosolic inclusion bodies of TEM1-β-lactamase. *Biotechnol*, 3, 1245–1255. <https://doi.org/10.1002/biot.200800072>

- Mays, R. W., Siemers, K. A., Fritz, B. A., Lowe, A. W., Van Meer, G., & Nelson, W. J. (1995). Hierarchy of mechanisms involved in generating Na/K-ATPase polarity in MDCK epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, *130*(5), 1105–1115. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.5.1105>
- Miles, A. J., & Wallace, B. A. (2016). Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chemical Society Reviews*, *45*(18), 4859–4872. <https://doi.org/10.1039/C5CS00084J>
- Mishra, N. K., Peleg, Y., Cirri, E., Belogus, T., Lifshitz, Y., Voelker, D. R., Apell, H., Garty, H., & Karlisch, S. J. D. (2011). FXYD Proteins Stabilize Na,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(11), 9699–9712. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.184234>
- Moghadam, M., Ganji, A., Varasteh, A., Falak, R., & Sankian, M. (2015). Refolding process of cysteine-rich proteins : Chitinase as a model. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, *4*(1), 3–8.
- Moraes, I., Evans, G., Sanchez-Weatherby, J., Newstead, S., & Stewart, P. D. S. (2014). Membrane protein structure determination - The next generation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1838*, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.010>
- Morth, J. P., Pedersen, B. P., Toustrup-Jensen, M. S., Sørensen, T. L.-M., Petersen, J., Andersen, J. P., Vilsen, B., & Nissen, P. (2007a). Crystal structure of the sodium–potassium pump. *Nature*, *450*(7172), 1043–1049. <https://doi.org/10.1038/nature06419>
- Morth, J. P., Pedersen, B. P., Toustrup-Jensen, M. S., Sørensen, T. L. M., Petersen, J., Andersen, J. P., Vilsen, B., & Nissen, P. (2007b). Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature*, *450*(7172), 1043–1049. <https://doi.org/10.1038/nature06419>
- Murty, B. S., Shankar, P., Raj, B., Rath, B. B., & Murday, J. (2013). Textbook of Nanoscience and Nanotechnology. In *Apuntes máster UDC*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28030-6>
- Nemecek, D., Stepanek, J., & Thomas, G. J. (2013). Raman spectroscopy of proteins and nucleoproteins. *Current Protocols in Protein Science*, *SUPPL.71*. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1708s71>

Núñez-Muñoz, L., Marcelino-Pérez, G., Calderón-Pérez, B., Pérez-Saldívar, M., Acosta-Virgen, K., González-Conchillos, H., Vargas-Hernández, B., Olivares-Martínez, A., Ruiz-Medrano, R., Roa-Velázquez, D., Morales-Ríos, E., Ramos-Flores, J., Torres-Franco, G., Peláez-González, D., Fernández-Hernández, J., Espinosa-Cantellano, M., Tapia-Sidas, D., Ramírez-Pool, J. A., Padilla-Viveros, A., & Xoconostle-Cázares, B. (2021). Recombinant antigens based on non-glycosylated regions from RBD SARS-COV-2 as potential vaccine candidates against covid-19. *Vaccines*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/vaccines9080928>

Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain The sodium-potassium pump (Na⁺, K⁺-ATPase) is responsible for establishing Na and K concentration gradients across the plasma membrane and therefore plays an esse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*, 13742–13747.

Oladepo, S. A., Xiong, K., Hong, Z., Asher, S. A., Handen, J., & Lednev, I. K. (2012). UV resonance raman investigations of peptide and protein structure and dynamics. *Chemical Reviews*, *112*(5), 2604–2628. <https://doi.org/10.1021/cr200198a>

Padilla-Benavides, T., Roldán, M. L., Larre, I., Flores-Benitez, D., Villegas-Sepúlveda, N., Contreras, R. G., Cerejido, M., & Shoshani, L. (2010). The polarized distribution of Na⁺,K⁺-ATPase: Role of the interaction between β subunits. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(13), 2217–2225. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0081>

Páez, O., Martínez-Archundia, M., Villegas-Sepúlveda, N., Roldan, M. L., Correa-Basurto, J., & Shoshani, L. (2019). A model for the homotypic interaction between Na⁺,K⁺-ATPase β₁ subunits reveals the role of extracellular residues 221-229 in its ig-like domain. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(18), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms20184538>

Prasad, S., Khadatare, P. B., & Roy, I. (2011). Effect of chemical chaperones in improving the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(13), 4603–4609. <https://doi.org/10.1128/AEM.05259-11>

Rafique, M., Tahir, M. B., Rafique, M. S., & Hamza, M. (2020). History and fundamentals of nanoscience and nanotechnology. In *Nanotechnology and Photocatalysis for Environmental Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821192-2.00001-2>

Rajasekaran, S. A., Palmer, L. G., Moon, S. Y., Alejandro, P., Apodaca, G. L., Harper, J. F., Zheng, Y., & Rajasekaran, A. K. (2001). Na, K-ATPase Activity Is Required for Formation of Tight Junctions, Desmosomes, and Induction of Polarity in Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 12(December), 3717–3732.

Reena, A., Munivenkatappa, S., & Muniveerappa, B. (2016). Production of Recombinant Proteins. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(4), 346–356. <https://doi.org/Http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356>

Renugopalakrishnan, V., & Lewis, R. V (Eds.). (2006). *Bionanotechnology Proteins to Nanodevices*. Springer Science & Business Media.

Rinas, U., Garcia-Fruitós, E., Corchero, J. L., Vázquez, E., Seras-Franzoso, J., & Villaverde, A. (2017). Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(9), 726–737. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.005>

Roca-Pinilla, R., López-Cano, A., Saubi, C., Garcia-Fruitós, E., & Arís, A. (2020). A new generation of recombinant polypeptides combines multiple protein domains for effective antimicrobial activity. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01380-7>

Rodríguez-Carmona, E., Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J., Villaverde, A., & García-Fruitós, E. (2010). Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 9:10, 1–9. <https://doi.org/http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/71>

Roldán, M. L., Ramírez-Salinas, G. L., Martínez-Archundia, M., Cuellar-Perez, F., Vilchis-Nestor, C. A., Cancino-Díaz, J. C., & Shoshani, L. (2022). The β_2 -Subunit (AMOG) of Human Na⁺, K⁺-ATPase Is a Homophilic Adhesion Molecule. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14). <https://doi.org/10.3390/ijms23147753>

Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, *166*(2), 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)

Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution resolution. *Nature*, *459*(7245), 446–450. <https://doi.org/10.1038/nature07939>

Shoshani, L., Contreras, R. G., Roldán, M. L., Moreno, J., Lázaro, A., Balda, M. S., Matter, K., & Cerejido, M. (2005). The Polarized Expression of Na⁺, K⁺-ATPase in Epithelia Depends on the Association between β-Subunits Located in Neighboring Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *15*, 1071–1081. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>

Silva, C. I. da, Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Moraes, B. P. T. de, Garcia, D. G., & Burth, P. (2021). Na/K-ATPase: Their role in cell adhesion and migration in cancer. *Biochimie*, *185*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.03.002>

Silvers, R., Schlepckow, K., Wirmer-Bartoschek, J., & Schwalbe, H. (2011). NMR-Spectroscopic Investigation of Disulfide Dynamics in Unfolded States of Proteins. In *Folding of Disulfide Proteins* (Vol. 14, pp. 217–256). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7273-6_10

Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>

Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta*, *23*, 394–401.

Sun, P. D., Foster, C. E., & Boyington, J. C. (2004). Overview of Protein Structural and Functional Folds. *Current Protocols in Protein Science*, *35*(1), 1–189. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1701s35>

- Tokhtaeva, E., Sachs, G., Souda, P., Bassilian, S., Whitelegge, J. P., Shoshani, L., & Vagin, O. (2011). Epithelial junctions depend on intercellular trans-interactions between the Na⁺,K⁺-ATPase β_1 subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25801–25812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252247>
- Tokhtaeva, E., Sachs, G., Sun, H., Dada, L. A., Sznajder, J. I., & Vagin, O. (2012). Identification of the amino acid region involved in the intercellular interaction between the β_1 subunits of Na⁺/K⁺-ATPase. *Journal of Cell Science*, 125 (6), 1605–1616. <https://doi.org/10.1242/jcs.100149>
- Tokhtaeva, E., Sachs, G., & Vagin, O. (2009). Assembly with the Na, K-ATPase $\alpha 1$ subunit is required for export of β_1 and β_2 subunits from the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 48(48), 11421–11431. <https://doi.org/10.1021/bi901438z>
- Tokhtaeva, E., Sun, H., Deiss-Yehiely, N., Wen, Y., Soni, P. N., Gabrielli, N. M., Marcus, E. A., Ridge, K. M., Sachs, G., Vazquez-Levin, M., Sznajder, J. I., Vagin, O., & Dada, L. A. (2016). The O-glycosylated ectodomain of FXYD5 impairs adhesion by disrupting cell-cell trans-dimerization of Na⁺, K⁺-ATPase β_1 subunits. *Journal of Cell Science*, 129(12), 2394–2406. <https://doi.org/10.1242/jcs.186148>
- Toyoshima, C., Kanai, R., & Cornelius, F. (2011). First crystal structures of Na⁺, K⁺-ATPase: New light on the oldest ion pump. *Structure*, 19(12), 1732–1738. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.10.016>
- Treuheit, M. J., Costello, C. E., & Kirley, T. L. (1993). Structures of the complex glycans found on the β -subunit of (Na, K)-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(19), 13914–13919. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)85189-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)85189-x)
- Upadhyay, A., Murmu, A., Singh, A., & Panda, A. (2012). Kinetics of Inclusion Body Formation and Its Correlation with the Characteristics of Protein Aggregates in Escherichia coli. *PLoS ONE*, 7(3), e33951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033951>
- Vagin, O., Tokhtaeva, E., & Sachs, G. (2006). The role of the β_1 subunit of the Na⁺, K⁺-ATPase and its glycosylation in cell-cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39573–39587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606507200>

Vagin, O., Tokhtaeva, E., Yakubov, I., Shevchenko, E., & Sachs, G. (2008). Inverse correlation between the extent of N-glycan branching and intercellular adhesion in epithelia: Contribution of the Na,K-ATPase β_1 subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 283(4), 2192–2202. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704713200>

van der Spoel, E., Rozing, M. P., Houwing-Duistermaat, J. J., Eline Slagboom, P., Beekman, M., de Craen, A. J. M., Westendorp, R. G. J., & van Heemst, D. (2015). Heterologous Expression of Membrane Proteins. In *Aging* (7).

Villar-Piqué, A., Espargaró, A., Ventura, S., & Sabate, R. (2016). In vivo amyloid aggregation kinetics tracked by time-lapse confocal microscopy in real-time. *Biotech Method*, 11, 172–177. <https://doi.org/10.1002/biot.201500252>

Walker, J. M. (2015). *Insoluble Proteins* (E. García-Fruitós (Ed.); Vol. 1258). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5>

Wang, C.-H., Huang, C.-C., Lin, L.-L., & Chen, W. (2016). The effect of disulfide bonds on protein folding, unfolding, and misfolding investigated by FT-Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47(8), 940–947. <https://doi.org/10.1002/jrs.4935>

Wang, R., Mangion, I., Makarov, A., & Kourouski, D. (2020). Use of Raman spectroscopy and size-exclusion chromatography coupled with HDX-MS spectroscopy for studying conformational changes of small proteins in solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 189, 113399. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113399>

Wen, Z. Q. (2007). Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(11), 2861–2878. <https://doi.org/10.1002/jps.20895>

Werner, M. H., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Kondoh, A., & Fisher, R. J. (1994). Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Letters*, 345(2–3), 125–130. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00401-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00401-3)

Wingfield, P. T., Palmer, I., & Liang, S. (1995). Folding and Purification of Insoluble (Inclusion Body) Proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*, 00(1), 1–27. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0605s00>

Yu, Z., Reid, J. C., & Yang, Y. P. (2013). Utilizing dynamic light scattering as a process analytical technology for protein folding and aggregation monitoring in vaccine manufacturing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *102*(12), 4284–4290. <https://doi.org/10.1002/jps.23746>

Zhang, Q., Jiang, Q., Li, N., Dai, L., Liu, Q., Song, L., Wang, J., Li, Y., & Tian, J. (2014). DNA Origami as an In Vivo Drug Delivery Vehicle for Cancer Therapy. *ACS Nano*, *7*, 6633–6643.

Zhou, C., Qi, W., Lewis, E. N., & Carpenter, J. F. (2015). Concomitant Raman spectroscopy and dynamic light scattering for characterization of therapeutic proteins at high concentrations. *Analytical Biochemistry*, *472*, 7–20. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.11.016>

Zhu, S., Meng, H., Gu, Z., & Zhao, Y. (2021). Research trend of nanoscience and nanotechnology-A bibliometric analysis of Nano Today. *Nano Today*, *39*, 101233. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101233>

Anexo 1. Ciclo catalítico de la bomba de sodio

La Na^+ , K^+ -ATPasa transporta tres iones Na^+ fuera y dos iones K^+ dentro de la célula por molécula de ATP hidrolizado y es dependiente de Mg^{2+} . El transporte sigue un mecanismo de “ping-pong”, en el que las dos especies de iones se transportan secuencialmente. El bombeo de iones se logra mediante la alternancia entre dos estados conformacionales principales, E_1 y E_2 . En la **Figura A1- 1**, primero los tres iones de Na^+ se unen a la proteína en el lado citoplasmático; cuando se une el tercer ion de Na^+ se cataliza una fosforilación por parte del ATP y Mg^{2+} ($E_1\text{P}$) previamente unidos. En la fosforilación el grupo fosforilo se transfiere a un residuo aspártico conservado en el dominio P en la subunidad- α , cuando el ADP sale se produce una forma de la proteína $E_1\text{P}(3\text{Na})$. Los iones de Na^+ unidos a la proteína ahora están ocluidos; en este estado la proteína puede ser desfosforilada por ADP, en la reacción inversa (intercambio ATP:ADP). En el curso normal del ciclo los iones Na^+ abandonan a la proteína en la superficie extracelular, el primer ion más rápidamente, enseguida, el segundo y el tercero más lento, pasando al estado $E_2\text{P}$. En este estado conformacional se unen los iones K^+ en la superficie extracelular; tras su unión, la NKA se desfosforila de modo que se libera P_i (en la superficie interna) y luego se ocluyen los iones K^+ para producir $E_2(2\text{K})$. La liberación de iones K^+ en el lado intracelular es catalizada por la unión de ATP ($E_2\text{ATP}(2\text{K})$) a un sitio con baja afinidad por ATP de alrededor de $150 \mu\text{M}$ ($E_1\text{ATP}(2\text{K})$). En este punto, la bomba vuelve al estado $E_1\text{ATP}$ con alta afinidad por el Na^+ lista para iniciar un nuevo ciclo catalítico tras liberar los iones K^+ ($E_1\text{ATP}$) (Kaplan, 2002; Lobato Álvarez *et al.*, 2016). Como consecuencia del transporte de iones se crean y mantiene gradientes de concentración a través de la membrana plasmática (Lacidogna *et al.*, 2017) los cuales tienen muchos propósitos, como el mantener el potencial de membrana, la osmolaridad, el pH y como una fuente de energía para el transporte activo secundario (Lacidogna *et al.*, 2017).

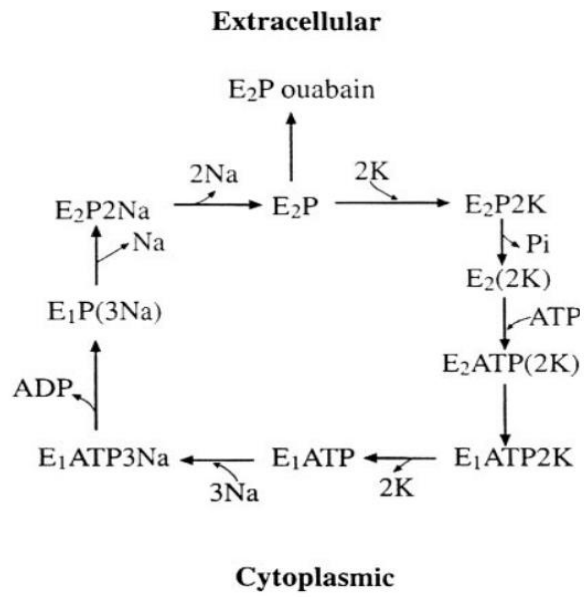


Figura A1- 2. El ciclo de reacción de la Na⁺, K⁺-ATPasa. La secuencia de pasos involucrados en el transporte activo de iones Na⁺ y K⁺ se muestra en el esquema de Post-Albers para el ciclo de reacción (Kaplan, 2002).

Anexo 2. Transformación de células químicamente competentes

La transformación de células químicamente competentes se realizó por el método de choque térmico con algunas modificaciones. Para ello, alícuotas de 50 μ L de *E. coli* TOP10 DH5 α , *E. coli* Mach1 T1 DH5 α , *E. coli* SoluBL2 DH3 o *E. coli* Rosetta DH3 se colocaron en un baño de hielo y se esperó hasta su descongelación. Inmediatamente, en condiciones de esterilidad se adicionó ADN a una concentración variable (ng de ADN) a las células contenidas en microtubos, enseguida se mezcló golpeándolo ligeramente cinco veces con la yema del dedo, y se mantuvo en hielo durante 30 min. Al finalizar el periodo de incubación, los microtubos se colocaron en un Thermoblock con una temperatura de 42 °C durante 35 s y rápidamente se incubaron en hielo por 2 min. Después se agregaron 400 μ L de medio SOC (triptona al 2%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) y se incubó a 37 °C durante 1 h a 150 rpm (agitación orbital). Enseguida, se centrifugaron los microtubos a 9000 rpm durante 60 s, el siguiente paso fue eliminar el sobrenadante procurando dejar aproximadamente 50 μ L para resuspender cuidadosamente la pastilla formada, toda la suspensión se sembró por agotamiento con ayuda de una espátula *Drigalsky* en cajas Petri que contenían medio agar *LB* (*Lisogenia Broth*) suplementado con el antibiótico de selección correspondiente (**Tabla A2-1**). Alternativamente, cuando se trató de *E. coli* Mach1 T1 DH5 α y *E. coli* Rosetta DH3, después de incubar a 37°C se tomaron 100 μ L y con ello se sembraron cajas Petri con medio agar *LB* suplementado con su antibiótico correspondiente. Después de sembrar las cajas se incubaron invertidas a 37°C de 12-20 h. Las colonias aisladas que crecieron en la superficie de la placa fueron seleccionadas como las contenedoras del ADN recombinante (vector), las cuales fueron tomadas con un palillo de madera estéril y sembradas por separado en 5 mL de *LB* suplementado con el antibiótico selección adecuado. En siguiente paso fue incubar a 37 °C de 8-12 h con agitación orbital constante (150 rpm). Por último, la biomasa se concentró por centrifugación (14000 rpm, 5 min) en microtubos y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit comercial QIAGEN Plasmid (QIAGEN, USA) o por método de lisis alcalina.

Tabla A2- 1. Antibióticos de selección de cada uno de los vectores usados en este proyecto. Se indica el vector, la cepa de *E. coli*, así como el antibiótico y la concentración usados.

Vector	Cepa <i>E. coli</i>	Antibiótico de selección	Concentración del antibiótico (µg/mL)
pUC57-EDβ ₁	TOP10 (DH5α)	Ampicilina	100
pRSET-EDβ ₁	TOP10 (DH5α)	Ampicilina	100
pRSET-EDβ ₁	SoluBL21 (DE3)	Ampicilina	100
pC8-EDβ ₁	Mach1 T1 (DH5α)	Espectinomicina	100
pCri-1a- EDβ ₁	Mach1 T1 (DH5α)	Espectinomicina	100
pCri-1a- EDβ ₁	Rosetta (DE3)	Kanamicina y Cloranfenicol	50 y 20
pCri-4a- EDβ ₁	Mach1 T1 (DH5α)	Espectinomicina	100
pCri-4a- EDβ ₁	Rosetta (DE3)	Kanamicina y Cloranfenicol	50 y 20
pCri-8a- EDβ ₁	Mach1 T1 (DH5α)	Espectinomicina	100
pCri-8a- EDβ ₁	Rosetta (DE3)	Kanamicina y Cloranfenicol	50 y 20

Anexo 3. Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

La pastilla que se formó al concentrar los 5 mL de cultivo bacteriano se colocó en baño de hielo. Se adicionaron 100 μ L de solución alcalina I (**Tabla A3-1**) y se suspendió la pastilla con ayuda de un vortex. Enseguida se añadieron 200 μ L de solución alcalina II (**Tabla A3-2**) preparada al momento y se mezcló invirtiendo el microtubo rápidamente 5 veces y se incubó en hielo. Se adicionaron 150 μ L de solución alcalina III (**Tabla A3-3**) e inmediatamente se mezcló invirtiendo varias veces el microtubo y se colocó en hielo durante 5 min. Para separar el precipitado formado se centrifugó a 14000 rpm por 5 min a 4 °C. Enseguida se transfirió el sobrenadante a un microtubo nuevo, cuidando de no tomar residuos de la pastilla formada. Se añadió un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) y se mezcló vigorosamente por vórtice, se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm. Al finalizar, se transfirió nuevamente la fase acuosa a un microtubo nuevo. Para precipitar los ácidos nucleicos se añadió un volumen de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló por vortex e incubó a temperatura ambiente de 15-30 min. El siguiente paso fue centrifugar a 14000 rpm por 5 min (algunas veces se observó una pastilla blanca), el sobrenadante se retiró y el tubo en posición invertida se dejó secar a 37 °C. Una vez seco, se realizó un lavado con 1 mL de etanol al 70 %, el ADN se recuperó por centrifugación a 14000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se retiró nuevamente y se dejó secar a 37 °C. Al microtubo completamente seco se adicionaron 50 μ L de agua desionizada y estéril para resuspender el ADN, para finalizar se almacenó a -20 °C.

Tabla A3- 1. Solución alcalina I.

Componente	Concentración del stock	Volumen (mL)	Concentración final (mM)
Glucosa	1 M	5	50
Tris-HCl pH 8.0	1 M	2.5	25
EDTA pH 8.0	0.5 M	2	10
Agua desionizada estéril	--	90.5	---

Tabla A3- 2. Solución alcalina II.

Componente	Concentración del stock	Volumen (μ L)	Concentración final (mM)
NaOH (diluir en fresco)	5 N	160	0.2 N
SDS	10%	400	1%
Agua desionizada estéril	--	3440	---

Tabla A3- 3. Solución alcalina III.

Componente	Concentración del stock	Volumen (mL)
Acetato de potasio	5 M	60
Ácido acético glacial	Puro	11.5
Agua desionizada estéril	----	28.5

Anexo 4. Pruebas de expresión del ED β ₁: pRSET-ED β ₁

El vector pRSET-ED β ₁ se transformó en *E. coli* SoluBL21 (DE3) empleando una concentración de ADN entre 100-500 ng y ampicilina 100 μ g/mL para su selección (**Anexo 1**). De la placa resultante se seleccionaron 3 colonias aisladas y se sembraron por separado en 1 mL de medio *LB* suplementado con ampicilina, enseguida se incubó durante 12 h, bajo agitación orbital constante y con una temperatura de 37 °C. Al finalizar el periodo de incubación, de cada tubo de cultivo se tomaron seis alícuotas de 10 μ L y se inocularon por separado nuevamente en 1 mL de caldo 2xYT (triptona al 1.6 %, extracto de levadura al 1 %, NaCl 85 mM) con ampicilina (100 μ g/mL), es decir, por cada colonia se sembraron seis tubos. Todos los cultivos se incubaron durante 3 h a 37 °C, con una agitación de 150 rpm. Para iniciar la expresión de la proteína, a cuatro cultivos de una colonia se les adiciono IPTG para obtener una concentración final de 1 mM, los dos cultivos restantes de los seis que se tenían corresponden a los controles negativos de expresión. Para continuar, un tubo de control negativo y dos con IPTG se incubaron a 37 °C y el resto de los tubos de cultivo se incubaron a temperatura ambiente. Esto se repitió con los otros cultivos de las dos colonias restantes. Después de 3 h de incubación se retiró un tubo de cultivo con IPTG de cada temperatura probada (37 °C y temperatura ambiente) por cada una de las tres colonias. El resto de los tubos se continuó incubando hasta completar 16 h. Todos los tubos de cultivo se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 min, se eliminó el sobrenadante y se adiciono 50 μ L de *buffer* para la muestra. Todos los tubos se colocaron en un Thermoblock con una temperatura de 99 °C durante 10 min. Todas las muestras se analizaron en geles de tricina-SDS-PAGE. En la **Figura A4-1** se muestra el gel de tricina-SDS-PAGE de la colonia en la que se observó mejor expresión del ED β ₁. El carril 1, 2 y 3 corresponden a la temperatura ambiente de expresión, por su parte el carril 4, 5 y 6 a la temperatura de 37 °C. Los carriles 1 y 4 corresponden a los controles negativos, donde no se observa una sobreexpresión de la proteína. El carril 2 y 5 corresponden a un tiempo de expresión de la proteína durante 3 h después de la adición de IPTG. Por último, el carril 3 y 6 son las muestras que se obtuvieron con un tiempo de inducción de 16 h. Es notable que la proteína se expresó mejor a una temperatura de 37 °C durante 16 h.

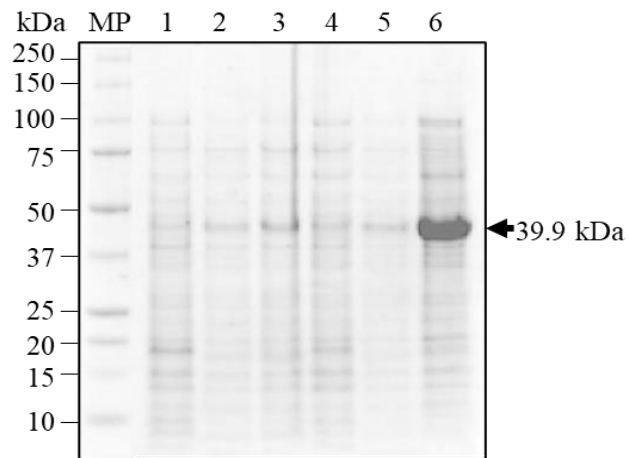


Figura A4- 1. Gel tricina-SDS-PAGE de las pruebas de expresión de la proteína empleando el vector *pRSET-ED β_1* y a *E. coli SoluBL21 (DE3)*. Se indica el marcado de peso (MP) en kDa.

Anexo 5: Preparación de geles tricina-SDS-PAGE

Este método está basado en lo reportado por Schägger & von Jagow (Schägger & von Jagow, 1987).

Tabla A5- 1. Cantidades para preparar geles SDS-PAGE con diferentes porcentajes de acrilamida.

Componente	% de acrilamida				Gel concentrador
	16	12	10	8	4%
Solución de acrilamida al 30 %	3.2 mL	2.4 mL	2 mL	1 mL	0.533 mL
Buffer para el gel	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	1 mL
Glicerol al 80%	0.8 mL	0.8 mL	0.8 mL	0.8 mL	-
Agua	-	0.8 mL	1.2 mL	1.6 mL	2.466 mL
Persulfato de amonio al 10 %	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL	40 µL
TEMED	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL	4 µL

Tabla A5- 2. Soluciones stock para el SDS-PAGE.

	Tris (g)	Tricina	pH	HCl (mL)	SDS
Buffer para el gel (100 mL)	36.34	-	8.25	8.5	0.3
Buffer de ánodo (1 L)	24.06 g	-	8.4	-	-
Buffer de cátodo (1L)	12.11 g	17.3 g		-	1

1. Solución de acrilamida 30 % (100 mL)

- Acrilamida 30 g
- Bis-acrilamida 0.8 g

2. Buffer para la muestra (10 mL)

- Agua 4 mL
- Buffer para el gel 1 mL
- Glicerol 3 mL
- SDS al 10 % 1 mL
- Azul de bromofenol 0.5% 0.5 mL

Para preparar las muestras solo se mezcló con el buffer para muestra sin ningún proceso de ebullición a las muestras preparadas, solo se procedió a cargar en el gel.

Anexo 6. Productividad del trabajo de tesis

Protein Expression and Purification 200 (2022) 106167



Contents lists available at ScienceDirect

Protein Expression and Purification

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yprep



Expression, purification, and refolding of the recombinant extracellular domain β_1 -subunit of the dog Na^+/K^+ -ATPase of the epithelial cells

Daniela Roa-Velázquez^a, Beatriz Xoconostle-Cázares^b, Claudia G. Benítez-Cardoza^c, Jaime Ortega-López^b, Liora Shoshani^{d,*}, Edgar Morales-Ríos^{e,**}, Salvador Gallardo-Hernández^{f,***}

^a Programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508, Ciudad de México, 07360, Mexico

^b Departamento de Bioingeniería y Biotecnología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508, Ciudad de México, 07360, Mexico

^c Laboratorio de Investigación Bioquímica, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-Instituto Politécnico Nacional, Guillermo Massieu Helguera 239, Ciudad de México, 07320, Mexico

^d Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508, Ciudad de México, 07360, Mexico

^e Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508, Ciudad de México, 07360, Mexico

^f Departamento de Física, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508, Ciudad de México, 07360, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Recombinant Na^+/K^+ -ATPase β_1 -subunit
Inclusion bodies
Refolding by SEC
 β_1 - β_1 interaction

ABSTRACT

The β_1 -subunit of the Na^+/K^+ -ATPase is a cell membrane protein, beyond its classic functions, it is also a cell adhesion molecule. β_1 -subunits on the lateral membrane of dog kidney epithelial cells *trans*-interact with β_1 -subunits from another neighboring cells. The β - β interaction is essential for the formation and stabilization of intercellular junctions. Previous studies on site-directed mutagenesis and *in silico* revealed that the interaction interface involves residues 198–207 and 221–229. However, it is necessary to report the interaction interface at the structural level experimentally. Here, we describe the successful cloning, overexpression in *E. coli*, and purification of the extracellular domain of the β_1 -subunit from inclusion bodies. Experimental characterization by size exclusion chromatography and DLS indicated similar hydrodynamic properties of the protein refolded. Structural analysis by circular dichroism and Raman spectroscopy revealed the secondary structures in the folded protein of type β -sheet, α -helix, random coil, and turn. We also performed β_1 - β_1 interaction assays with the recombinant protein, showing dimers' formation (6xHis β_1 - β_1). Given our results, the recombinant extracellular domain of the β_1 -subunit is highly similar to the native protein, therefore the current work in our laboratory aims to characterize at the atomic level the interaction interface between ED β_1 .

1. Introduction

The Na^+/K^+ -ATPase, or sodium pump (NKA), is a heterooligomeric membrane protein responsible for the electrochemical gradient in all animal cells; it consists of α , β , and γ subunits. The β -subunit shows biological functions that include appropriate folding, trafficking, and proper insertion of NKA into the plasma membrane. In addition, this

subunit confers stability to the α -subunit and regulates enzyme activity [1]; three β isoforms are known (β_1 - β_3) [2]. The β_1 -subunit contains 303 amino acid residues consisting of an N-terminal cytoplasmic domain, a transmembrane segment, and a large extracellular C-terminal domain with a globular domain [3]. It has three N-glycosylation sites (Asn158, Asn193, Asn265) [4] and three disulfide bonds (Cys126-Cys149, Cys159-Cys175, Cys213-Cys276) that are conserved between all

* Corresponding author.

** Corresponding author.

*** Corresponding author.

E-mail addresses: daniela.roa@cinvestav.mx (D. Roa-Velázquez), bxoconos@cinvestav.mx (B. Xoconostle-Cázares), beni1972uk@gmail.com (C.G. Benítez-Cardoza), jortega@cinvestav.mx (J. Ortega-López), shoshani@cinvestav.mx (L. Shoshani), edgar.morales@cinvestav.mx (E. Morales-Ríos), salvador.gallardo@cinvestav.mx (S. Gallardo-Hernández).

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106167>

Received 18 July 2022; Received in revised form 24 August 2022; Accepted 26 August 2022

Available online 31 August 2022

1046-5928/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo 7. Productividad adicional relacionada con el proyecto COVID-19

El protocolo implementado para la recuperación del ED β ₁ desde IBs en este proyecto también fue adaptó para la recuperación del dominio de unión al receptor (RBD) del virus del SARS-CoV-2 en conjunto con Jessica G. Filísola Villaseñor y Dan I. Zavala Vargas en el laboratorio de Estudios Estructurales de Motores Moleculares a cargo del Dr. Edgar Morales Ríos. Esto generó varias colaboraciones con otros grupos de investigación.



Article

Combination of Recombinant Proteins S1/N and RBD/N as Potential Vaccine Candidates

Noe Juvenal Mendoza-Ramírez ¹, Julio García-Cordero ¹, Sandra Paola Martínez-Frías ¹, Daniela Roa-Velázquez ², Rosendo Luria-Pérez ³, José Bustos-Arriaga ⁴, Jesús Hernández-Lopez ⁵, Carlos Cabello-Gutiérrez ⁶, Joaquín Alejandro Zúñiga-Ramos ⁷, Edgar Morales-Ríos ², Sonia Mayra Pérez-Tapia ⁸, Martha Espinosa-Cantellano ⁹ and Leticia Cedillo-Barrón ^{1,*}

¹ Departamento de Biomedicina Molecular, Cinvestav, Av. IPN # 2508 Col, Mexico City 07360, Mexico

² Departamento de Bioquímica, Cinvestav, Av. IPN # 2508 Col, Mexico City 07360, Mexico

³ Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City 06720, Mexico; rhuria@himfg.edu.mx

⁴ Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios # 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalneapantla 54090, Mexico

⁵ Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) Carretera a la Victoria km 0.6, Hermosillo Sonora 83304, Mexico

⁶ Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), Departamento de Investigación en Virología y Micología, Calzada de Tlalpan 4502, Belisario Domínguez, Tlalpan 14080, Mexico

⁷ Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas y Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey 64849, Mexico

⁸ Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioterapéuticos (UDIBI), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México City 11340, Mexico

⁹ Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav, Av. IPN # 2508 Col, San Pedro Zacatenco, México City 07360, Mexico

* Correspondence: lcedillo@cinvestav.mx



Citation: Mendoza-Ramírez, N.J.; García-Cordero, J.; Martínez-Frías, S.P.; Roa-Velázquez, D.; Luria-Pérez, R.; Bustos-Arriaga, J.; Hernández-Lopez, J.; Cabello-Gutiérrez, C.; Zúñiga-Ramos, J.A.; Morales-Ríos, E.; et al. Combination of Recombinant Proteins S1/N and RBD/N as Potential Vaccine Candidates. *Vaccines* **2023**, *11*, 864. <https://doi.org/10.3390/vaccines11040864>

Academic Editor: Hejun Liu

Received: 23 February 2023

Revised: 29 March 2023

Accepted: 30 March 2023

Published: 18 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Despite all successful efforts to develop a COVID-19 vaccine, the need to evaluate alternative antigens to produce next-generation vaccines is imperative to target emerging variants. Thus, the second generation of COVID-19 vaccines employ more than one antigen from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) to induce an effective and lasting immune response. Here, we analyzed the combination of two SARS-CoV-2 viral antigens that could elicit a more durable immune response in both T- and B-cells. The nucleocapsid (N) protein, Spike protein S1 domain, and receptor binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike surface glycoproteins were expressed and purified in a mammalian expression system, taking into consideration the posttranscriptional modifications and structural characteristics. The immunogenicity of these combined proteins was evaluated in a murine model. Immunization combining S1 or RBD with the N protein induced higher levels of IgG antibodies, increased the percentage of neutralization, and elevated the production of cytokines TNF- α , IFN- γ , and IL-2 compared to the administration of a single antigen. Furthermore, sera from immunized mice recognized alpha and beta variants of SARS-CoV-2, which supports ongoing clinical results on partial protection in vaccinated populations, despite mutations. This study identifies potential antigens for second-generation COVID-19 vaccines.

Keywords: SARS-CoV-2; vaccine; nucleocapsid protein; spike protein; RBD domain

1. Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the etiological agent of coronavirus disease 2019 (COVID-19), which has become one of the biggest threats to global health and has been responsible for over 6.7 million deaths worldwide since its emergence in November 2019 [1–3].



Jacareubin inhibits TLR4-induced lung inflammatory response caused by the RBD domain of SARS-CoV-2 Spike protein

Deisy Segura-Villalobos¹ · Daniela Roa-Velázquez² · Dan I. Zavala-Vargas² · Jessica G. Filisola-Villaseñor² · Jorge Ivan Castillo Arellano³ · Edgar Morales Ríos² · Ricardo Reyes-Chilpa³ · Claudia González-Espinosa¹

Received: 10 March 2022 / Revised: 19 July 2022 / Accepted: 22 July 2022 / Published online: 5 August 2022
© The Author(s) under exclusive licence to Maj Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences 2022

Abstract

Background COVID-19, the disease caused by SARS-CoV-2 virus infection, has been a major public health problem worldwide in the last 2 years. SARS-CoV-2-dependent activation of innate immune receptors contributes to the strong local and systemic inflammatory reaction associated with rapid disease evolution. The receptor-binding domain (RBD) of Spike (S) viral protein (S-RBD) is essential for virus infection and its interacting molecules in target cells are still under identification. On the other hand, the search for accessible natural molecules with potential therapeutic use has been intense and remains an active field of investigation.

Methods C57BL/6J (control) and Toll-like receptor (TLR) 4-deficient (*Lps del*) mice were nebulized with recombinant S-RBD. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and Interleukin (IL)-6 production in bronchoalveolar lavages (BALs) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Lung-infiltrating cells recovered in BALs were quantified by hematoxylin–eosin (H&E) stain. In selected groups of animals, the natural compound Jacareubin or dexamethasone were intraperitoneally (ip) administered 2 hours before nebulization.

Results A rapid lung production of TNF- α and IL-6 and cell infiltration was induced by S-RBD nebulization in control but not in *Lps del* mice. Pre-treatment with Jacareubin or dexamethasone prevented S-RBD-induced TNF- α and IL-6 secretion in BALs from control animals.

Conclusions S-RBD domain promotes lung TNF- α and IL-6 production in a TLR4-dependent fashion in C57BL/6J mice. Xanthone Jacareubin possesses potential anti-COVID-19 properties that, together with the previously tested anti-inflammatory activity, safety, and tolerance, make it a valuable drug to be further investigated for the treatment of cytokine production caused by SARS-CoV-2 infection.

Keywords Coronavirus · RBD · Spike protein · TLR4 · Lung inflammation

✉ Ricardo Reyes-Chilpa
chilpa@unam.mx

✉ Claudia González-Espinosa
cgonzal@cinvestav.mx

¹ Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) Unidad Sede Sur, Calzada de los Tenorios No. 235, Col. Granjas Coapa, Tlalpan, 14330 Mexico City, Mexico

² Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), 07360 Mexico City, Mexico

³ Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior s/n. Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico

Abbreviations

ACE-2	Angiotensin-converting enzyme
BAL	Bronchoalveolar lavage
COVID-19	Coronavirus disease 2019
EU	Endotoxin unit
IL-1 β	Interleukin 1- β
IL-6	Interleukin 6
ip	Intraperitoneally
LAL	Limulus amoebocyte lysate
RBD	Receptor-binding domain
S-RBD	RBD of the Spike protein
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
S	Spike
TLR4	Toll-like receptor 4

ARTICLE

ADAM17/MMP inhibition prevents neutrophilia and lung injury in a mouse model of COVID-19

Nathaniel L. Lartey¹ | Salvador Valle-Reyes¹ | Hilda Vargas-Robles¹ |
 Karina E. Jiménez-Camacho¹ | Idaira M. Guerrero-Fonseca¹ |
 Ramón Castellanos-Martínez¹ | Armando Montoya-García¹ | Julio García-Cordero¹ |
 Leticia Cedillo-Barrón¹ | Porfirio Nava² | Jessica G. Filisola-Villaseñor³ |
 Daniela Roa-Velázquez³ | Dan I Zavala-Vargas³ | Edgar Morales-Ríos³ |
 Citlaltepelt Salinas-Lara⁴ | Eduardo Vadillo⁵ | Michael Schnoor¹

¹ Department of Molecular Biomedicine, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

² Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

³ Department of Biochemistry, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

⁴ Instituto Nacional de Neurología, Mexico City, Mexico

⁵ Oncology Research Unit, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico

Correspondence

Michael Schnoor, Department of Molecular Biomedicine, CINVESTAV-IPN, Mexico City 07360, Mexico.

Email: mschnoor@cinvestav.mx

Abstract

Severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) is characterized by lung injury, cytokine storm, and increased neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR). Current therapies focus on reducing viral replication and inflammatory responses, but no specific treatment exists to prevent the development of severe COVID-19 in infected individuals. Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) is the receptor for SARS-CoV-2, the virus causing COVID-19, but it is also critical for maintaining the correct functionality of lung epithelium and endothelium. Coronaviruses induce activation of a disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17) and shedding of ACE2 from the cell surface resulting in exacerbated inflammatory responses. Thus, we hypothesized that ADAM17 inhibition ameliorates COVID-19-related lung inflammation. We employed a preclinical mouse model using intratracheal instillation of a combination of polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)) and the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein (RBD-S) to mimic lung damage associated with COVID-19. Histologic analysis of inflamed mice confirmed the expected signs of lung injury including edema, fibrosis, vascular congestion, and leukocyte infiltration. Moreover, inflamed mice also showed an increased NLR as observed in critically ill COVID-19 patients. Administration of the ADAM17/MMP inhibitors apratastat and TMI-1 significantly improved lung histology and prevented leukocyte infiltration. Reduced leukocyte recruitment could be explained by reduced production of proinflammatory cytokines and lower levels of the endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. Additionally, the NLR was significantly reduced by ADAM17/MMP inhibition. Thus, we propose inhibition of ADAM17/MMP as a novel promising treatment strategy in SARS-CoV-2-infected individuals to prevent the progression toward severe COVID-19.

Abbreviations: ACE2, Angiotensin-converting enzyme-2; ADAM17, A disintegrin and metalloprotease 17; ALI, Acute lung injury; BALF, Bronchoalveolar lavage fluid; COVID-19, Coronavirus disease 2019; ICAM-1, Intercellular adhesion molecule 1; MMP, Matrix metalloprotease; NETs, Neutrophil extracellular traps; NLR, Neutrophil-to-lymphocyte ratio; Poly I:C, Polyinosinic:polycytidylic acid; RBD-S, Receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein; SARS-CoV-2, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; TACE, TNF- α -converting enzyme; VCAM-1, Vascular cell adhesion molecule 1.

Article

Recombinant Protein Expression and Purification of N, S1, and RBD of SARS-CoV-2 from Mammalian Cells and Their Potential Applications

Julio García-Cordero ¹, Juvenal Mendoza-Ramírez ¹, David Fernández-Benavides ², Daniela Roa-Velazquez ³, Jessica Filisola-Villaseñor ³, Sandra Paola Martínez-Frías ¹, Erik Saul Sanchez-Salguero ¹, Carlos E. Miguel-Rodríguez ¹, Jose L. Maravillas Montero ⁴, Jose J. Torres-Ruiz ⁵, Diana Gómez-Martín ⁵, Leopoldo Santos Argumedo ¹, Edgar Morales-Ríos ³, Juan M. Alvarado-Orozco ² and Leticia Cedillo-Barrón ^{1,*}



Citation: García-Cordero, J.; Mendoza-Ramírez, J.; Fernández-Benavides, D.; Roa-Velazquez, D.; Filisola-Villaseñor, J.; Martínez-Frías, S.P.; Sanchez-Salguero, E.S.; Miguel-Rodríguez, C.E.; Maravillas Montero, J.L.; Torres-Ruiz, J.J.; et al. Recombinant Protein Expression and Purification of N, S1, and RBD of SARS-CoV-2 from Mammalian Cells and Their Potential Applications. *Diagnostics* **2021**, *11*, 1808. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11101808>

Academic Editor: Renato Million

Received: 28 May 2021

Accepted: 27 August 2021

Published: 30 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Departamento de Biomedicina Molecular CINVESTAV IPN, Av. IPN # 2508 Col, San Pedro Zacatenco, México City 07360, Mexico; jugarcia@cinvestav.mx (J.G.-C.); noe.mendoza@cinvestav.mx (J.M.-R.); paola.martinez@cinvestav.mx (S.P.M.-F.); erick.sanchez@cinvestav.mx (E.S.S.-S.); carlos.miguel@cinvestav.mx (C.E.M.-R.); lesantos@cinvestav.mx (L.S.A.)

² Centro de Ingeniería y Desarrollo Industrial (CIDESI), Av. Playa Pie de la Cuesta No. 702, Desarrollo San Pablo, Querétaro 76125, Mexico; david.fernandez@cidesi.edu.mx (D.F.-B.); juan.alvarado@cidesi.edu.mx (J.M.A.-O.)

³ Departamento de Bioquímica CINVESTAV IPN, Av. IPN # 2508 Col, San Pedro Zacatenco, México City 07360, Mexico; daniela.roa@cinvestav.mx (D.R.-V.); jessica.filosola@cinvestav.mx (J.F.-V.); edgar.morales@cinvestav.mx (E.M.-R.)

⁴ Red de Apoyo a la Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, México City 14080, Mexico; maravillas@cic.unam.mx

⁵ Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, México City 14080, Mexico; jiram_torres@hotmail.com (J.J.T.-R.); d_gomar@hotmail.com (D.G.-M.)

* Correspondence: lcedillo@cinvestav.mx

Abstract: The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has reached an unprecedented level. There is a strong demand for diagnostic and serological supplies worldwide, making it necessary for countries to establish their own technologies to produce high-quality biomolecules. The two main viral antigens used for the diagnostics for severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2) are the structural proteins spike (S) protein and nucleocapsid (N) protein. The spike protein of SARS-CoV-2 is cleaved into S1 and S2, in which the S1 subunit has the receptor-binding domain (RBD), which induces the production of neutralizing antibodies, whereas nucleocapsid is an ideal target for viral antigen-based detection. In this study, we designed plasmids, pcDNA3.1/S1 and pcDNA3.1/N, and optimized their expression of the recombinant S1 and N proteins from SARS-CoV-2 in a mammalian system. The RBD was used as a control. The antigens were successfully purified from Expi293 cells, with high yields of the S1, N, and RBD proteins. The immunogenic abilities of these proteins were demonstrated in a mouse model. Further, enzyme-linked immunosorbent assays with human serum samples showed that the SARS-CoV-2 antigens are a suitable alternative for serological assays to identify patients infected with COVID-19.

Keywords: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; coronavirus disease; spike protein; nucleocapsid; receptor binding domain

1. Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a recently identified virus that is responsible for the current pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19), which has globally infected and killed millions of people and has seriously damaged the world economy [1,2]. Patients with COVID-19 can be asymptomatic or symptomatic. The

Article

Recombinant Antigens Based on Non-Glycosylated Regions from RBD SARS-CoV-2 as Potential Vaccine Candidates against COVID-19

Leandro Núñez-Muñoz ^{1,†}, Gabriel Marcelino-Pérez ^{1,2,†}, Berenice Calderón-Pérez ¹, Miriam Pérez-Saldívar ³, Karla Acosta-Virgen ³, Hugo González-Conchillos ³, Brenda Vargas-Hernández ¹, Ana Olivares-Martínez ¹, Roberto Ruiz-Medrano ¹, Daniela Roa-Velázquez ^{2,4}, Edgar Morales-Ríos ⁴, Jorge Ramos-Flores ⁵, Gustavo Torres-Franco ⁵, Diana Peláez-González ⁵, Jorge Fernández-Hernández ⁵, Martha Espinosa-Cantellano ³, Diana Tapia-Sidas ¹, José Abrahan Ramírez-Pool ¹, América Padilla-Viveros ⁶ and Beatriz Xococonostle-Cázares ^{1,*}



Citation: Núñez-Muñoz, L.; Marcelino-Pérez, G.; Calderón-Pérez, B.; Pérez-Saldívar, M.; Acosta-Virgen, K.; González-Conchillos, H.; Vargas-Hernández, B.; Olivares-Martínez, A.; Ruiz-Medrano, R.; Roa-Velázquez, D.; et al. Recombinant Antigens Based on Non-Glycosylated Regions from RBD SARS-CoV-2 as Potential Vaccine Candidates against COVID-19. *Vaccines* **2021**, *9*, 928. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080928>

Academic Editor: Elena A. Govorkova

Received: 6 July 2021
Accepted: 18 August 2021
Published: 20 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Department of Biotechnology and Bioengineering, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; leandro.nunez@cinvestav.mx (L.N.-M.); gabriel.marcelino@cinvestav.mx (G.M.-P.); berecalpe@yahoo.com.mx (B.C.-P.); byvargas@cinvestav.mx (B.V.-H.); olivaresmtz.ana@cinvestav.mx (A.O.-M.); rmedrano@cinvestav.mx (R.R.-M.); dianaa.tapia@cinvestav.mx (D.T.-S.); jramirezp@cinvestav.mx (J.A.R.-P)
 - ² Doctoral Program in Nanosciences and Nanotechnology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; daniela.roa@cinvestav.mx
 - ³ Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; mperezs@cinvestav.mx (M.P.-S.); kbacosta@cinvestav.mx (K.A.-V.); hdgonzalez@cinvestav.mx (H.G.-C.); mespinosac@cinvestav.mx (M.E.-C.)
 - ⁴ Department of Biochemistry, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; edgar.morales@cinvestav.mx
 - ⁵ Laboratory Animal Production and Experimentation Unit, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; battousai_slayer@hotmail.com (J.R.-F.); franco308228727@gmail.com (G.T.-F.); dianapel94@hotmail.com (D.P.-G.); jofeman@cinvestav.mx (J.F.-H.)
 - ⁶ Transdisciplinary Doctoral Program in Scientific and Technological Development for Society, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México City 07360, Mexico; aviveros@cinvestav.mx
- * Correspondence: bxoconos@cinvestav.mx; Tel.: +52-(55)-57473318
† These authors contributed equally as first authors.

Abstract: The Receptor-Binding Domain (RBD) of the Spike (S) protein from Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has glycosylation sites which can limit the production of reliable antigens expressed in prokaryotic platforms, due to glycan-mediated evasion of the host immune response. However, protein regions without glycosylated residues capable of inducing neutralizing antibodies could be useful for antigen production in systems that do not carry the glycosylation machinery. To test this hypothesis, the potential antigens NG06 and NG19, located within the non-glycosylated S-RBD region, were selected and expressed in *Escherichia coli*, purified by FPLC and employed to determine their immunogenic potential through detection of antibodies in serum from immunized rabbits, mice, and COVID-19 patients. IgG antibodies from sera of COVID-19-recovered patients detected the recombinant antigens NG06 and NG19 ($A_{450\text{ nm}} = 0.80 \pm 0.33$; 1.13 ± 0.33 ; and 0.11 ± 0.08 for and negatives controls, respectively). Also, the purified antigens were able to raise polyclonal antibodies in animal models evoking a strong immune response with neutralizing activity in mice model. This research highlights the usefulness of antigens based on the non-N-glycosylated region of RBD from SARS-CoV-2 for candidate vaccine development.

Keywords: SARS-CoV-2; receptor binding domain; Spike protein; vaccine; viral glycosylation; prokaryotic expression

Original Research

Natural Soil Clays from a Phaeozem to Synthesize a Nanocomposite with Exhausted Coffee Grounds and Ag- and TiO₂-Nanoparticles for Water, Air, or Soil Decontamination

Vianey Urdapilleta-Inchaurregui¹, Fabián Fernández-Luqueño^{2*},
Aidé Minerva Torres-Huerta³, Daniela Roa-Velázquez¹,
Francisco Javier Rodríguez-Varela², María Esther Sánchez-Castro²

¹Programa de Nanociencias y Nanotecnología, Cinvestav, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Ciudad de México, 07000, México

²Sustainability of Natural Resources and Energy Programs, Cinvestav-Salttillo, Av. Industria Metalúrgica 1062, Parque Industrial Saltillo-Ramos Arizpe, Ramos Arizpe, Coahuila, 25900, Mexico

³Instituto Politécnico Nacional, CICATA-Altamira, km 14.5 Carr. Tampico-Pto. Ind. Altamira, Altamira, Tams. México, 89600, Mexico

Received: 27 January 2020

Accepted: 14 April 2020

Abstract

A nanocomposite using natural clays from a Phaeozem soil, engineered Ag-nanoparticles (NP), TiO₂-NP, and exhausted coffee grounds was synthesized through a single-step by thermal method, to degrade or filtrate pollutants from soils, water or air. The surface characteristics and the porosity of the composite were studied through nitrogen gas adsorption and application of the Brunauer-Emmett-Teller (BET) equation, and the microporous composites ranged a surface area of 17.36 m² g⁻¹. X-ray diffraction showed the crystalline structure and crystalline phase of the nanocomposites. High-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) and scanning transmission electron microscopy (STEM) demonstrated that TiO₂-NP surrounded Ag-NP, and both were impregnated on natural soil NP. Oxidation states of the Ag-NP and TiO₂-NP were analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The energy gap of nanocomposite 8NC was determined by Ultraviolet-visible diffuse reflectance (UV-Visible DRS). The photocatalytic activity of this nanocomposite was evaluated. The results indicated that nanocomposite with Phaeozem-soil-NP (8NC) degraded 82.31% of the harmful organic compound methylene blue (MB) by 150 minutes, while the antimicrobial activity and resistance against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and the zone of inhibition (ZOI) were 15 mm. The nanocomposite Ag-NP/TiO₂-NP/natural-soil-NP/exhausted

*e-mail: cinves.cp.cha.luqueno@gmail.com

Nanocomposite Synthesis from a Natural Clay-Rich Soils and Exhausted Coffee Grounds for Environmental Applications

Vianey Urdapilleta-Inchaurregui^{1,a}, Fabián Fernández-Luqueño^{2,b*},
Aidé Minerva Torres-Huerta^{3,c}, Daniela Roa-Velázquez^{1,d},
Francisco Javier Rodríguez-Varela^{2,e} and María Esther Sánchez-Castro^{2,f}

¹Programa de Nanociencias y Nanotecnología, Cinvestav, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Ciudad de México, 07000, México

²Sustainability of Natural Resources and Energy Programs, Cinvestav-Salttillo, Av. Industria Metalúrgica 1062, Parque Industrial Saltillo-Ramos Arizpe, Ramos Arizpe, Coahuila, 25900, Mexico

³Instituto Politécnico Nacional, UPII Hidalgo, Carretera Pachuca-Actopan km 1+500, Pachuca Cd del Conocimiento y la Cultura, San Agustín Tlaxiaca, 42162 Hidalgo, México.

^avurdapilletas@cinvestav.mx, ^bcinves.cp.cha.luqueno@gmail.com, ^catorresh@ipn.mx, ^ddaniela.roa@cinvestav.mx, ^ejavier.varela@cinvestav.edu.mx, ^festher.sanchez@cinvestav.edu.mx

Keywords: antimicrobial; environmental pollution; nanoremediation; natural soil; photocatalytic; photodegradation; remediation; surface area; water treatment.

Abstract. Natural clays, engineered Ag-nanoparticles (NP), TiO₂-NP, and exhausted coffee grounds were used to synthesize a nanocomposite 7NC using a Vertisol soil through a single-step by thermal method, to build a nanomaterial to degrade or filtrate pollutants from soils, water or air. The surface characteristics and the porosity of the composite were studied through nitrogen gas adsorption at liquid nitrogen temperature and application of the Brunauer–Emmett–Teller (BET) equation and the results indicated that the microporous composites ranged a surface area of 17.36 m² g⁻¹. X-ray diffraction showed crystalline structure and crystalline phase of the nanocomposites. HR-TEM-STEM results demonstrated that TiO₂-NP surrounded Ag-NP, and both were impregnated on natural soil nanoparticles. Oxidation states of the Ag-NP and TiO₂-NP were analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) The energy gap of nanocomposite 7NC was determined using the Kubelka-Munck model from Ultraviolet–visible diffuse reflectance (UV–Visible DRS) spectra. The photocatalytic activity of these nanocomposites was evaluated, and the results indicated that nanocomposite with Vertisol-soil-NP (7NC) degraded the harmful organic compound methylene blue (MB) while the antimicrobial activity and resistance against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and the zone of inhibition (ZOI) also were analyzed. The nanocomposites Ag-NP/TiO₂-NP/natural-soil-NP/exhausted coffee-ground showed its for the development of an efficient material for environmental remediation with photocatalytic and antimicrobial activity.

Introduction

Currently, the water pollutants include complex xenobiotic substances, known as emerging contaminants (ECs), along with organic matter and microorganisms [1]; all of these contaminants have been sensed in drinking water sources, increasing the hazards of illness as a result of intake unclean water [2]. There are different techniques of removal treatments to dissipate contaminants such as coagulation-flocculation, activated carbon adsorption (ACs), ozonation, advanced oxidation processes (AOPs), membrane processes, and membrane bioreactor, among others.

However, the adsorbent synthesis methods must be evaluated because they could change the usage time, particle size, and morphology. At the same time, they must be analyzed for the physicochemical properties of EC to know if adsorbents can chelate them. Besides, the reuse and regeneration of adsorbents should be monitored, making them environmentally friendly [3].

Some nanoparticles, such as TiO₂-NP, Ag-NP, or soil clays, have been used in environmental decontamination [4]. TiO₂ has been identified as one of the semiconductors with a high photocatalytic

Anexo 9. Participación en congresos



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

Latin American Protein Society
In collaboration with
Sociedad Mexicana de Bioquímica
certifie that

Daniela Roa Velazquez
presented the work

Recombinant expression of the ectodomain of β 1 subunit of Na⁺,K⁺-ATPase in *Escherichia coli*

at

VI Latin American Protein Society Meeting and
VII Congreso de la Rama de Fisiocquímica, Estructura y Diseño de Proteínas
20-23 October 2019, Mexico City



Dr. D. Alejandro Fernández Velasco
Organizing Committee