



Universidad Nacional Autónoma de México
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Química

Efecto de la oxidoreductasa DsbC en el plegamiento de la toxina Ts16

Tesis

Que para optar por el grado de
Maestro en Ciencias Bioquímicas

Presenta:

Q. Jacob Alejandro Hernández Tapia

Director de tesis:

Dr. José Federico del Río Portilla
Instituto de Química

Miembros del comité tutor:

Dr. José Federico del Río Portilla
Instituto de Química
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Facultad de Química
Dr. Enrique García Hernández
Instituto de Química



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Resumen

Las enzimas con actividad oxidorreductasa han sido utilizadas para replegar proteínas estabilizadas por enlaces disulfuro[1]–[4]. No obstante, la información sobre su uso en el replegamiento de toxinas es limitada[5]. Este trabajo contribuyó a explorar la utilidad de la enzima DsbC en el replegamiento de una toxina de alacrán. Se evaluó el replegamiento *in vitro* asistido con DsbC recombinante (rDsbC) sobre la toxina del alacrán *Tytus serrulatus* GS-Ts16, péptido estabilizado por tres enlaces disulfuro y cuya biosíntesis en *Escherichia coli* genera dos estados de plegamiento estables con conectividades distintas entre cisteínas [6], [7].

La enzima rDsbC sobreexpresada en *Escherichia coli* muestra el plegamiento y la actividad propias de la enzima. Se obtuvo el espectro de Dicroísmo Circular en la zona del UV lejano, que es semejante al reportado en la literatura[8] en cuanto a la forma pero no en cuanto a la magnitud de las señales. Adicionalmente, se determinó que la actividad enzimática de rDsbC favorece el replegamiento de lisozima no nativa al detectarse un aumento en la actividad lítica de la lisozima replegada sobre *Micrococcus luteus*. Adicionalmente, se observó que la actividad enzimática de rDsbC es semejante a su homólogo eucarionte PDI, al comparar la lisozima replegada con ambas enzimas por separado.

El péptido GS-Ts16 fue biosintetizado bajo el protocolo previamente descrito[6] y se demostró que la toxina purificada muestra el plegamiento nativo al compararse los espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protón con los espectros usados para elucidar la estructura reportada de la proteína nativa (PDB 2OL7)[6]. Así, se preparó el péptido para usarlo como sustrato de la enzima rDsbC bajo varias condiciones de replegamiento y siguiendo el curso de la reacción con la ocurrencia de especies de GS-Ts16 en cromatografía de fase reversa. Se concluyó que la enzima rDsbC es ineficiente en el replegamiento del péptido GS-Ts16.

Agradecimientos

Al Dr. José Federico del Río Portilla, al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres y al Dr. Enrique García Hernández por integrar el comité tutorial de este proyecto. Quienes enriquecieron son sus comentarios y pertinentes observaciones a este proyecto de tesis.

A los miembros del jurado: Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig, Dr. Daniel Alejandro Fernández, Dr. Gerardo Corzo Burguete y Dr. Luis Fernando Olguín Contreras. Quienes revisaron a profundidad el trabajo escrito de esta investigación y contribuyeron con valiosas y acertadas sugerencias en el formato, contenido, redacción y presentación de resultados.

A la Dra. Patricia Cano Sánchez del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Química, por la asesoría técnica y guía en la realización de los experimentos contenidos en este manuscrito.

Al Cepario del departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM, por proporcionar una muestra de la cepa de *Micrococcus luteus* usado en los ensayos de actividad lítica de lisozima.

Al proyecto PAPIIT-DGAPA con número IN210319, por el presupuesto para la realización del proyecto presentado. Con el cuál se adquirieron los insumos, la enzima PDI y se realizaron todos los experimentos de espectrometría de masas MALDI-TOF, espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de protón y espectroscopia de Dicroísmo Circular.

Al CONACyT por la beca de maestría número 824144.

Contenido

Resumen.....	2
Agradecimientos	3
Introducción	5
Marco teórico	6
Enlace disulfuro	6
Proteína isomerasa de enlaces disulfuro (PDI).....	7
Sistema de proteínas Dsb	8
Proceso de oxidación.....	9
Proceso de isomerización	13
Replegamiento <i>in vitro</i> asistido por enzimas.....	19
Sustratos para rDsbC.....	20
Toxina Ts16.....	21
Hipótesis	23
Objetivo principal	23
Objetivos particulares.....	23
Materiales y métodos	24
Producción recombinante de DsbC	24
Caracterización de rDsbC	25
Producción recombinante de GS-Ts16.....	25
Evaluación de la actividad de rDsbC	26
Renaturalización de GM-Ts16 asistida por rDsbC.....	27
Resultados	29
Expresión y purificación de rDsbC	29
Expresión y purificación de GS-Ts16	32
La enzima rDsbC contribuye en el replegamiento de lisozima	36
Renaturalizar GS-Ts16 con rDsbC produce especies distintas a las esperadas.....	39
Discusión	44
rDsbC actúa como chaperona durante la renaturalización de lisozima.....	44
La renaturalización favorece una especie de GS-Ts16 que es distinta a la nativa	45
Conclusiones	47
Perspectivas.....	47
Referencias.....	48

Introducción

La principal limitante para estudiar una proteína radica en su obtención. El aislamiento directo de su fuente biológica ofrece la ventaja de extraer la proteína con todas sus modificaciones post-traduccionales. Una de las desventajas es el reducido rendimiento de producto extraído, lo que requiere el manejo de elevadas cantidades de la fuente natural. Por otro lado, la biosíntesis en sistemas de expresión heteróloga plantea la posibilidad de obtener suficiente cantidad de proteína para su estudio. No obstante, las desventajas incluyen la obtención de un producto con modificaciones post-traduccionales distintas a las nativas o no existentes[9] y la agregación en aglomeraciones insolubles de la proteína sobreexpresada.

Escherichia coli es el sistema de expresión heteróloga más utilizado; preferencia atribuida a tres características fundamentales. En primera instancia, su cinética de crecimiento, en las condiciones de cultivo más favorables muestra un tiempo de duplicación de 20 minutos; como consecuencia, se pueden obtener cultivos cuya densidad óptica ronda la unidad en poco tiempo. La segunda radica en la facilidad para producir proteínas con características especiales, como proteínas enriquecidas con ^{13}C y ^{15}N . Tercero, por su capacidad para aceptar ADN exógeno[9]. Hasta Agosto de 2020, se han depositado 121,230 estructuras en la base de datos PDB (por sus siglas en inglés) de proteínas expresadas en *Escherichia coli* [10].

Hablando de proteínas expresadas en *Escherichia coli*, un caso particular son las proteínas estabilizadas por enlaces disulfuro. Los enlaces disulfuro son un estado oxidado del residuo de cisteína y el citoplasma de *Escherichia coli* es de carácter reductor; así, los métodos de expresión en citoplasma no son la mejor opción para producir este tipo de proteínas en su forma nativa oxidada[11]–[13]. Los enlaces disulfuro en el citoplasma se producen a partir de la acción de los variados componentes citoplasmáticos con actividad oxidorreductasa, provocando que los grupos tiol de las cisteínas se oxiden y reduzcan de forma dinámica; este efecto favorece una sustancial cantidad de conectividades entre cisteínas inter e intramoleculares, lo que se refleja en una diversidad en conectividades[14].

Para subsanar esta limitación, se han desarrollado alternativas a partir del esclarecimiento de los mecanismos usados en los organismos para producir proteínas con sus cisteínas oxidadas en una conectividad correcta[11], [15]. Los métodos propuestos incluyen desde la obtención de las proteínas de interés ya oxidadas desde el hospedero por exportación hacia el compartimiento que contiene los mecanismos enzimáticos; hasta la utilización de dichos mecanismos enzimáticos fuera de la célula en métodos *in vitro*[16].

A continuación, se abordarán las bases teóricas más relevantes para este trabajo. Las cuales incluyen la formación de los enlaces disulfuro en proteínas y los sistemas enzimáticos más relevantes en procariontes y eucariontes. Prosiguiendo con el uso de estos sistemas enzimáticos en experimentos de replegamiento, particularmente sobre la enzima DsbC. Finalmente se introducirá el péptido GS-Ts16 y la relevancia para determinar un método de replegamiento asistido por la enzima DsbC.

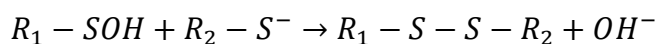
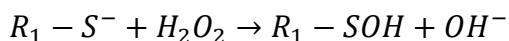
Marco teórico

Enlace disulfuro

El estudio de la formación de los enlaces disulfuro comenzó a mediados del siglo XX. Entonces se creía que los enlaces disulfuro se formaban espontáneamente dentro de las células vivas. Sin embargo, este dogma pereció en 1991 con el descubrimiento de una enzima periplásmica de *Escherichia coli* que es requerida en la catálisis de la formación de los enlaces disulfuro[11], [12].

Los enlaces disulfuro son vitales para el plegamiento y la estructura terciaria de muchas proteínas que son secretadas al medio. El efecto en la estabilidad de una proteína, producido por un enlace disulfuro es de aproximadamente 4 kcal/mol. La formación de enlaces disulfuro con una conectividad distinta a la nativa puede causar agregados moleculares o que sea degradada por proteasas[17].

La formación de los enlaces disulfuro en proteínas puede darse espontáneamente por oxidación de dos grupos tioles, provenientes de residuos de cisteína, debido al oxígeno molecular presente en el medio[17]. La reacción de formación de enlaces disulfuro es básicamente una reacción de oxidación[12]. El agente oxidante reacciona con los tiolatos de las cisteínas para producir radicales tiolilo; estos radicales tiolilo reaccionan con otro tiol de cisteína para producir el enlace disulfuro[18]. Por ejemplo, cuando se adiciona peróxido de hidrógeno a una muestra de proteína previamente reducida, el mecanismo de reacción involucra la formación del ácido sulfénico propio del residuo de cisteína. Este intermediario reacciona subsecuentemente con otro tiolato de un segundo residuo de cisteína, generándose el enlace disulfuro[18].



El citoplasma de muchas células no es adecuado para la producción de proteínas con enlaces disulfuro. Aunque los enlaces disulfuro pueden formarse pasajeramente, son rápidamente reducidos por el gran número de reductasas y las pequeñas moléculas reductoras presentes en el citoplasma, como el glutatión [11]. La concentración de glutatión en el citoplasma de *Escherichia coli* es de aproximadamente 5 mM y la relación con su par Redox (GSH/GSSG) se encuentra entre 50/1 y 200/1; ambos proveen al citoplasma su carácter reductor[17]. Adicionalmente, el pH habitual del citoplasma de *Escherichia coli* es aproximadamente de 7.6 [19], mientras que el pKa del grupo tiol de la cisteína libre es de 8.3 [20]; por tanto, cerca del 10 % de las cisteínas están protonadas en el citoplasma, siempre y cuando su pKa no se vea modificado significativamente por otros aminoácidos circundantes.

Muchas de las proteínas que requieren un plegamiento estabilizado mediante enlaces disulfuro no pueden hacerlo en el citoplasma debido al ambiente reductor existente, tanto en células procariontes como en eucariontes. No obstante, varias de estas proteínas son

producidas para incorporarlas a la membrana externa o para contenerse en los compartimientos no-citoplasmáticos, donde adquirirán su forma activa[21].

Se conocen dos compartimientos no-citoplasmáticos con carácter oxidativo: el periplasma en las células procariontes de tipo Gram negativa y el retículo endoplasmático en las células eucariontes[11], en las bacterias Gram positivas, existe un espacio semejante al periplasma de las gran negativas entre el peptidoglicano y la membrana lipídica [15]. Ambos compartimientos son el lugar donde residen las enzimas responsables de la formación de los enlaces disulfuro en las proteínas cuyo plegamiento está estabilizado por enlaces disulfuros. En la mayoría de los organismos eucariotas se ha determinado que la proteína isomerasa de disulfuros (PDI por sus siglas en inglés) es la responsable de la formación de los enlaces disulfuro cuando son exportados al retículo endoplasmático[22]. Por otro lado, se ha comprobado que el periplasma de los organismos procariotas contiene una familia de proteínas que catalizan la formación de los enlaces disulfuro en las proteínas recién translocadas a dicho compartimiento celular; esta familia de proteínas es la “Dsb” (Disulfide Bond)[17].

Proteína isomerasa de enlaces disulfuro (PDI)

El plegamiento oxidativo en eucariontes tiene lugar en el lumen del retículo endoplasmático, en donde los integrantes de la familia de proteínas isomerasas de disulfuros (PDI por sus siglas en inglés) son pieza clave del procedimiento[22]. Aislada del hígado bovino[23], PDI es una glicoproteína monomérica de 57 kDa cuyo contenido de carbohidratos es del 12 % (m/m); compuesto por 4.6 % D-manosa, 2.5 % D-galactosa, 1.4 % ácido N-acetilneuramínico (NANA) y 3.5 % N-acetilglucosamina[24]. Presenta un potencial estándar de reducción condicional (E°) de -180 mV[22].

Pertenece a la superfamilia de la tiorredoxina, por conservar un marcado grado de similitud estructural con la tiorredoxina y tener un sitio activo con secuencia CXXC[25]. La enzima está conformada por cinco dominios, dos de ellos, a y a', son homólogos a la tiorredoxina, catalizan reacciones de oxidación-reducción y actúan de forma independiente entre sí. El sitio activo CXXC se localiza en la asa entre la hebra $\beta 2$ y la hélice $\alpha 2$ de los dominios a y a'[22]. Por otro lado, los dominios b y b' también poseen el plegamiento tipo tiorredoxina, pero carecen del sitio activo de tipo CXXC. Sin embargo, el dominio b' presenta un sitio de unión a péptidos. El dominio c en la región del carboxilo terminal, solo incluye la secuencia KDEL típica para la retención en el retículo endoplasmático[25]. El orden de los dominios desde el extremo amino terminal es a-b-a'-b'-c[14]. El denominado plegamiento tipo tiorredoxina está compuesto por cinco hebras β flanqueadas por cuatro hélices α en un arreglo $\beta - \alpha - \beta - \alpha - \beta - \alpha - \beta - \beta - \alpha$ [25].

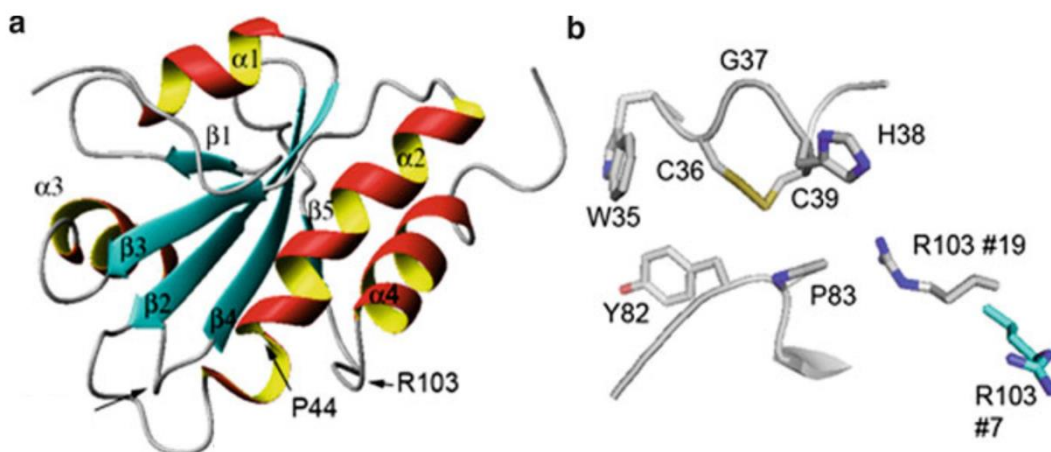


Figura 1. Estructura de PDI (a) y sitio activo (b). a) Se presenta la estructura tridimensional resuelta por RMN del dominio a de PDI (PDB 1MEK), se señalan las hebras y hélices propias del plegamiento tipo tiorredoxina. b) Sitio activo de PDI. Señalándose el motivo WCXHC, además de los residuos Arg103, Tyr 82 y Pro83 que contribuyen a la acidez del tiol del residuo Cys39. Imagen modificada de Wallis (2013)[22].

En el proceso de isomerización, la forma reducida de PDI dirige un ataque nucleofílico tipo S_N2 . El tiol nucleofílico del residuo de cisteína Cys39 de PDI ataca al enlace disulfuro de la proteína sustrato, desplazando los electrones hacia el residuo Cys36, que adquiere la forma de tiol. Entonces se forma momentáneamente un complejo activado entre la proteína sustrato y la PDI mediante un enlace disulfuro. Inmediatamente, el segundo grupo tiol nucleofílico de la proteína sustrato ataca el nuevo enlace disulfuro sobre el residuo de cisteína propio de la proteína sustrato, desplazando los electrones hacia el residuo Cys39 de la PDI, regenerándose la enzima[25]. Adicionalmente, el residuo Arg103 es responsable del carácter ácido del residuo Cys39[22] (Figura 1).

El primer estudio de la acción de PDI demostró que cataliza el plegamiento oxidativo del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI por sus siglas en inglés), interviniendo en los pasos donde hay intercambio de disulfuros y cambio conformacional[22]. En el caso particular de la lisozima, PDI mostró un incremento dramático tanto en el rendimiento de replegamiento como en la velocidad de replegamiento oxidativo, interviniendo catalíticamente en la conversión del intermediario [76-94] al estado nativo[26].

Sistema de proteínas Dsb

La mayoría de las proteínas periplásmicas de la familia Dsb presentan un plegamiento tipo tiorredoxina y un sitio activo de tipo CXXC, donde C representa los residuos de cisteína y X cualquier otro residuo de aminoácido. Las proteínas Dsb están involucradas en dos tipos de procesos: de oxidación (DsbA y DsbB) y de isomerización (DsbC, DsbD y DsbG)[17].

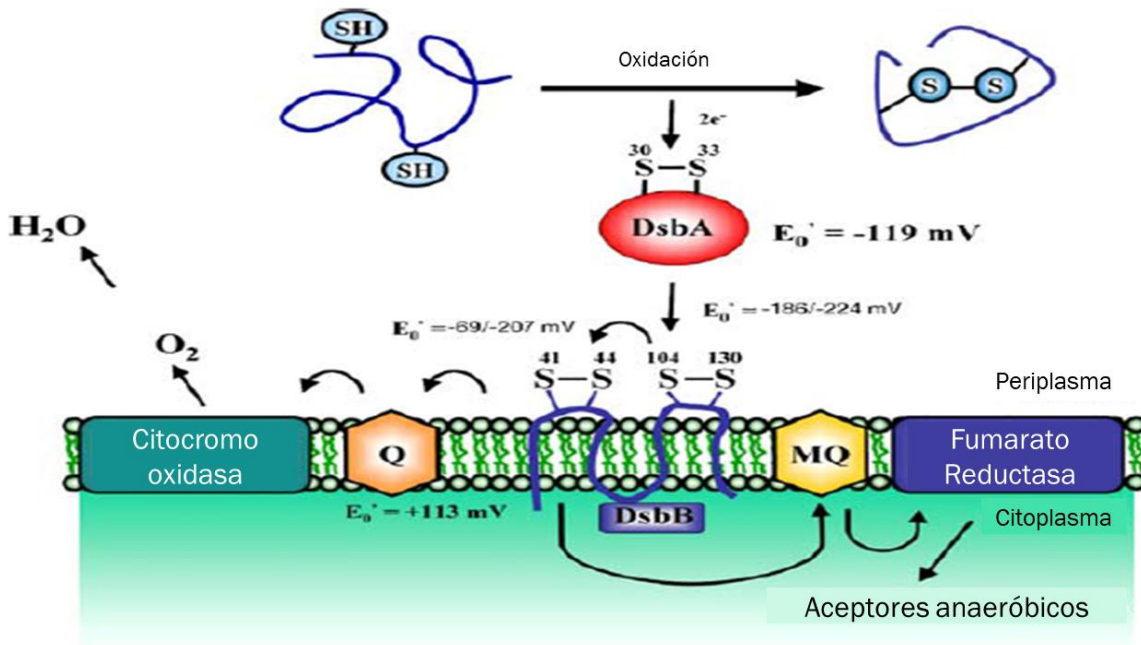


Figura 2. Proceso de formación de enlaces disulfuro mediado por las proteínas DsbA y DsbB. Una proteína con dos cisteínas reducidas es sustrato de la enzima DsbA en el proceso de oxidación para generar la proteína sustrato oxidada con la formación del enlace disulfuro y la enzima DsbA reducida. Las flechas negras (con excepción de la que indica el proceso de oxidación proteica) indica el flujo de los electrones desde la enzima DsbA hacia la enzima de membrana DsbB. De la enzima DsbB hay dos posibilidades en función de la disponibilidad de oxígeno en el medio. En condiciones aerobias se transfieren a la ubiquinona (Q) y luego a la citocromo oxidasa, en donde el flujo continua hacia el oxígeno y a la molécula de agua. En condiciones anaerobias los electrones se transfieren a la menaquinona (MQ) y luego a la fumarato reductasa, de aquí se dirigen a los aceptores anaeróbicos del citoplasma. Imagen modificada de Messens y Collet (2006)[17].

Proceso de oxidación

Las enzimas involucradas en el proceso de oxidación son DsbA y DsbB[11], [12], [17] (Figura 2).

Este proceso es una transferencia de electrones que comienza por el par de electrones del grupo tiol de cada uno de los residuos de cisteína que formarán el enlace covalente, los cuales son transferidos a la cisteína presente en el sitio activo de la enzima DsbA[12]. El sitio activo de la proteína DsbA se encuentra inicialmente oxidado, formando un enlace disulfuro[27]. Por ello, se hace la analogía de que hay una transferencia del enlace disulfuro desde la forma oxidada de DsbA hacia la proteína sustrato[11]. La forma reducida de DsbA debe reoxidarse antes de participar en un nuevo ciclo de transferencia de enlace, la enzima DsbB es la encargada de reoxidar a la DsbA recibiendo sus electrones[27], [28].

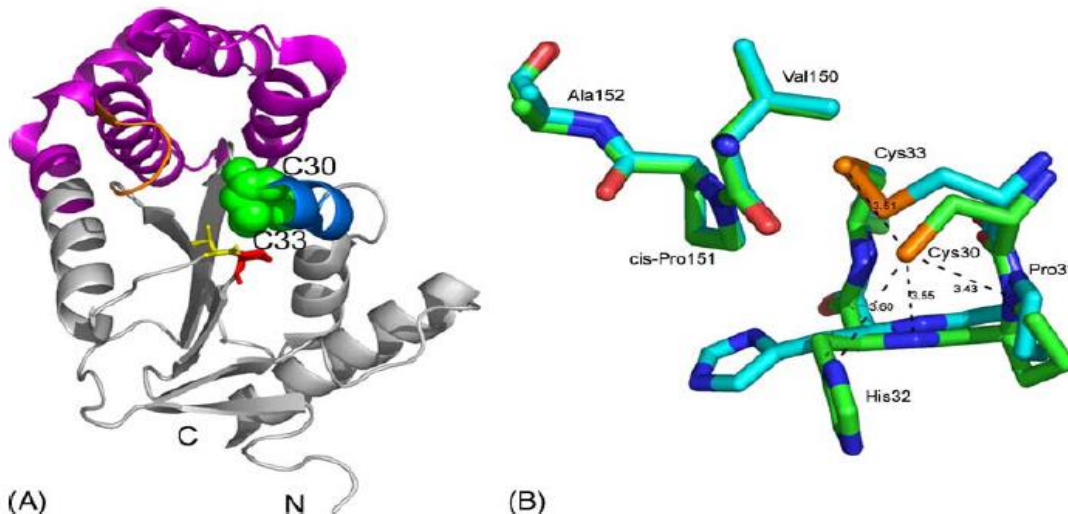


Figura 3. Enzima DsbA. A) Plegamiento tridimensional de la DsbA (PDB 1FVK). El dominio con plegamiento tipo tiorredoxina se muestra con el color gris, mientras que el dominio α -hélice es de color morado, el conector que une ambos dominios está representada por el color naranja, en azul se representa el sitio activo y en rojo está el residuo de prolina 151. La N y la C indican los extremos terminales amino y carboxilo respectivamente. B) Representación del sitio activo de la DsbA. En color cian se representa la forma oxidada del mismo (PDB 1A2M), mientras que en color verde la forma reducida (PDB 1A2L). Se muestran las interacciones interatómicas que se establecen con el átomo de azufre del residuo Cys30. Figura modificada de Messens y Collet (2006)[17].

Proteína DsbA

La proteína DsbA es una proteína periplásmica soluble y monomérica de 21 kDa que pertenece a la superfamilia de las tiorredoxinas [11], [12]. El sitio activo de esta proteína está conformado por los residuos Cys30-Pro31-His32-Cys33, donde Cys30 y Cys33 se encuentran formando un enlace disulfuro, característico de la forma oxidada y activa de la enzima[17], [27]. DsbA presenta un potencial estándar de reducción condicional (E°) de -120 mV[12], [17], lo que la hace mucho más oxidante que la tiorredoxina citoplasmática ($E^{\circ} = -270$ mV)[12].

DsbA está compuesta por dos dominios, un dominio α -hélice y otro con plegamiento tipo tiorredoxina (Figura 3). El dominio α -hélice consiste en cuatro α -hélices, mientras que el dominio con plegamiento tipo tiorredoxina está conformado por cinco hebras β y tres α -hélices. El sitio activo de la enzima está localizado en la región amino terminal de la primera α -hélice del dominio con plegamiento tipo tiorredoxina[17].

El mecanismo que sigue la DsbA para la formación de enlaces disulfuro en el sustrato es vía un ataque nucleofílico tipo S_N2 [12]. El tiol nucleofílico del residuo de cisteína de la proteína sustrato ataca el enlace disulfuro de la DsbA sobre el residuo Cys30, desplazando los electrones hacia el residuo Cys33, que adquiere la forma de tiol. Entonces se forma momentáneamente un complejo activado entre la proteína sustrato y la DsbA mediante un

enlace disulfuro. Inmediatamente, el segundo grupo tiol nucleofílico de la proteína sustrato ataca al nuevo enlace disulfuro sobre el residuo de cisteína de la proteína sustrato, desplazando los electrones hacia el residuo Cys30 de la DsbA, que adquiere la forma de tiol[11], [12]. Este mecanismo es soportado por dos hechos. El primero es que el residuo Cys30 es más reactivo que el residuo Cys33, debido a que su pKa es mucho más ácido, con un pKa de 3.5[17], que el correspondiente a un grupo tiol normal[27]. El segundo es el estado oxidado de la DsbA, que es el estado menos estable comparado con su estado reducido, de manera que termodinámicamente está favorecida la transferencia del enlace disulfuro para cambiar del estado oxidado al reducido[27].

El sitio activo de la DsbA se encuentra inmerso en una cavidad que tiene una superficie libre de residuos cargados, generando un carácter hidrofóbico dentro de la misma[17]. Así las proteínas desestructuradas pueden ingresar a esta cavidad donde mantienen interacciones hidrofóbicas. Además, la forma oxidada de la proteína es mucho más flexible que la forma reducida, facilitando el ingreso de los péptidos[17].

En el sitio opuesto al sitio activo se encuentra un residuo de prolina (151) en conformación *cis* (Figura 3 A, resaltado en rojo), que es esencial para la estabilidad de la enzima. Este residuo de prolina es altamente conservado en muchas proteínas con dominios que presentan plegamiento tipo tiorredoxina[17].

La DsbA es una enzima oxidante muy poderosa[27], debido que comienza a actuar sobre las proteínas sustrato cuando estas aún están transitando por la membrana hacia el periplasma[11], [28], [29]. Lo que desemboca en proteínas con enlaces disulfuro secuenciales, es decir, formados entre cisteínas localizadas secuencialmente en la cadena polipeptídica. La DsbA es capaz de formar enlaces disulfuro que son termodinámicamente inestables, que en muchos casos son enlaces completamente distintos a los apropiados para un correcto funcionamiento de la proteína sustrato[30].

Proteína DsbB

La DsbB es una proteína monomérica de 20 KDa integral de la membrana interna que está conformada de cuatro hélices transmembranales y dos asas periplásmicas[12], [17], [31]. Esta enzima posee cuatro residuos de cisteína muy conservados, necesarios para su correcto funcionamiento, localizados en las dos asas periplásmicas. Los residuos Cys41 y Cys44 se localizan en la asa amino terminal y los residuos Cys104 y Cys130 en la asa carboxilo terminal; además, ésta es la única proteína de la familia de las Dsbs que no presenta un dominio tipo tiorredoxina[17].

La DsbB es la enzima encargada de reoxidar a la DsbA[32]. El residuo Cys104 interactúa con el residuo Cys30 de la enzima DsbA reducida; se transfiere el enlace disulfuro formado entre los residuos Cys 104 y Cys 130 de la DsbB para formarse un complejo activado entre ambas enzimas[17], [31]. Este complejo es muy inestable, de manera que el residuo Cys33 de la DsbA ataca nucleofílicamente el enlace disulfuro entre ambas proteínas, generándose una nueva DsbA oxidada y dejando a la DsbB reducida[31].

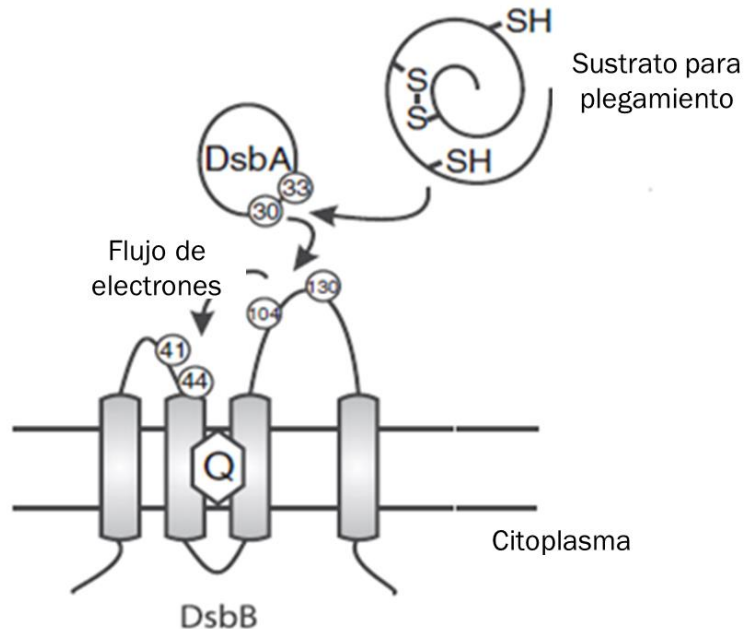


Figura 4. Flujo de electrones desde la proteína DsbA hasta la proteína DsbB. La cisteína 30 de DsbA ataca nucleofílicamente el enlace disulfuro 104-130 de DsbB. Los electrones continúan su flujo hacia el segundo enlace disulfuro entre los residuos 41 y 44 de la misma DsbB. Finalmente son aceptados por la ubiquinona (Q) en condiciones aeróbicas. Imagen modificada de Hatahet et al. (2014).

La oxidación del sitio CXXC de la DsbA por la DsbB por el mecanismo propuesto es una reacción termodinámicamente desfavorecida ($\Delta G=2.96$ Kcal/mol), el E° para el enlace entre Cys30 y Cys33 de la DsbA es de -120 mV[12], mientras que el E° para el enlace Cys104 y Cys130 de la DsbB es de -186 mV[33]. Sin embargo, los electrones transferidos desde la DsbA a la DsbB en los residuos Cys104 y Cys130 son nuevamente transferidos de forma intramolecular hacia los residuos Cys41 y Cys44[12], cuyo E° es de -69 mV[33], de manera que esta transferencia de electrones provee la suficiente energía para realizar la oxidación de la DsbA[17] (Figura 2 y 4).

La DsbB, que se encuentra reducida, debe desplazar dicho poder reductor para ser activa nuevamente[32]. La transferencia de electrones, en condiciones de aerobiosis, es desde la DsbB hacia la ubiquinona[29], quien a su vez transfiere los electrones hacia las citocromo oxidasas, quienes finalmente los transfieren al oxígeno molecular. En condiciones de anaerobiosis, los electrones son transferidos desde la DsbB hacia la menaquinona[29], quien posteriormente los transfiere hacia las fumarato y nitrato reductasas (Figura 2)[17].

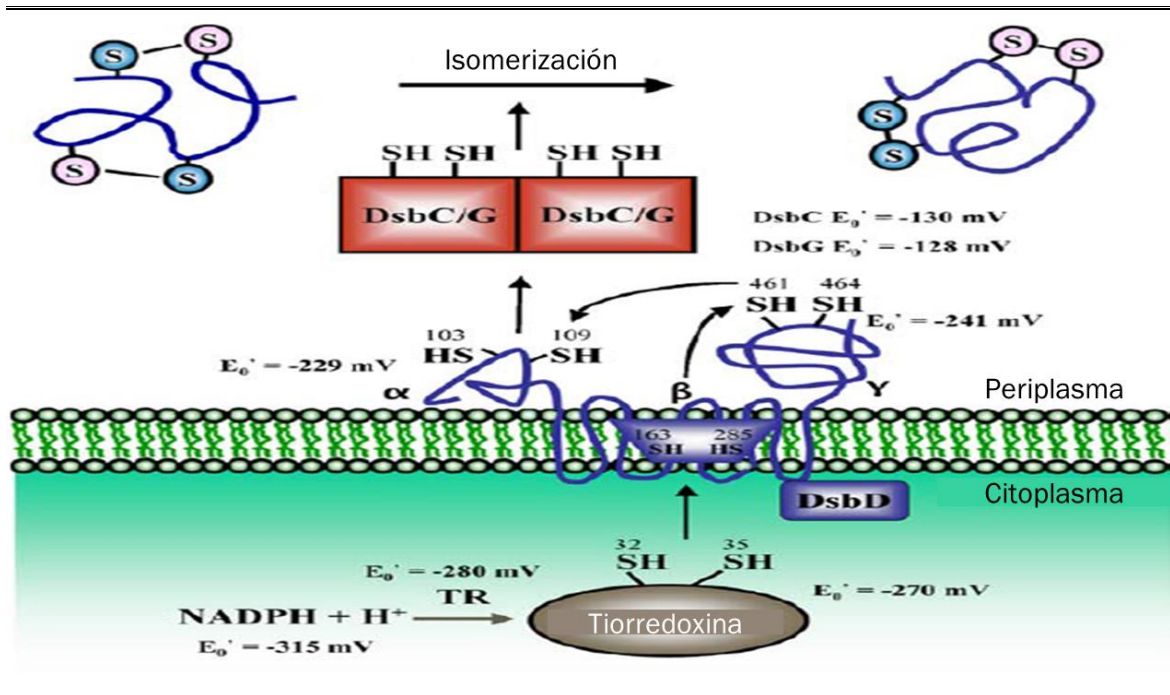


Figura 5. Proceso de isomerización de los enlaces disulfuro mediado por las proteínas DsbC o DsbG y la DsbD. El flujo de electrones está dado por las flechas negras. El NADPH transfiere sus electrones a la tiorredoxina (TR), la tiorredoxina interactúa con la cara citoplasmática de la DsbD. Los electrones fluyen por la enzima DsbD hacia el periplasma, donde el dímero DsbC/G adquiere los electrones. La enzima reducida DsbC/G actúa sobre las proteínas con enlaces disulfuro no nativo en la reacción de isomerización para generar la forma con conectividad nativa de la proteína sustrato y la enzima DsbC/G oxidada. Imagen modificada de Messens y Collet (2006).

Proceso de isomerización

Las enzimas involucradas en el proceso de isomerización son DsbC, DsbG y DsbD (Figura 5). Estas proteínas se encargan del reordenamiento de los enlaces disulfuro formados por la DsbA para generar los enlaces termodinámicamente más estables[11], [12], [17], [29]. Las proteínas DsbC y DsbG son prácticamente similares en función y estructura. Ambas actúan como isomerasas de enlaces disulfuro[11], [17], [34].

Estas proteínas comparten una estructura homodimérica, que adquiere una forma de “V”, un sitio activo con la forma característica CXXC en cada una de sus subunidades y está dispuesto hacia el interior de la abertura de la “V”. El sitio activo se encuentra en su forma reducida[34].

A partir de aquí se referirá únicamente a la proteína DsbC; sin embargo, la proteína DsbG puede actuar básicamente de la misma forma, salvo por pequeños detalles en su estructura [17].

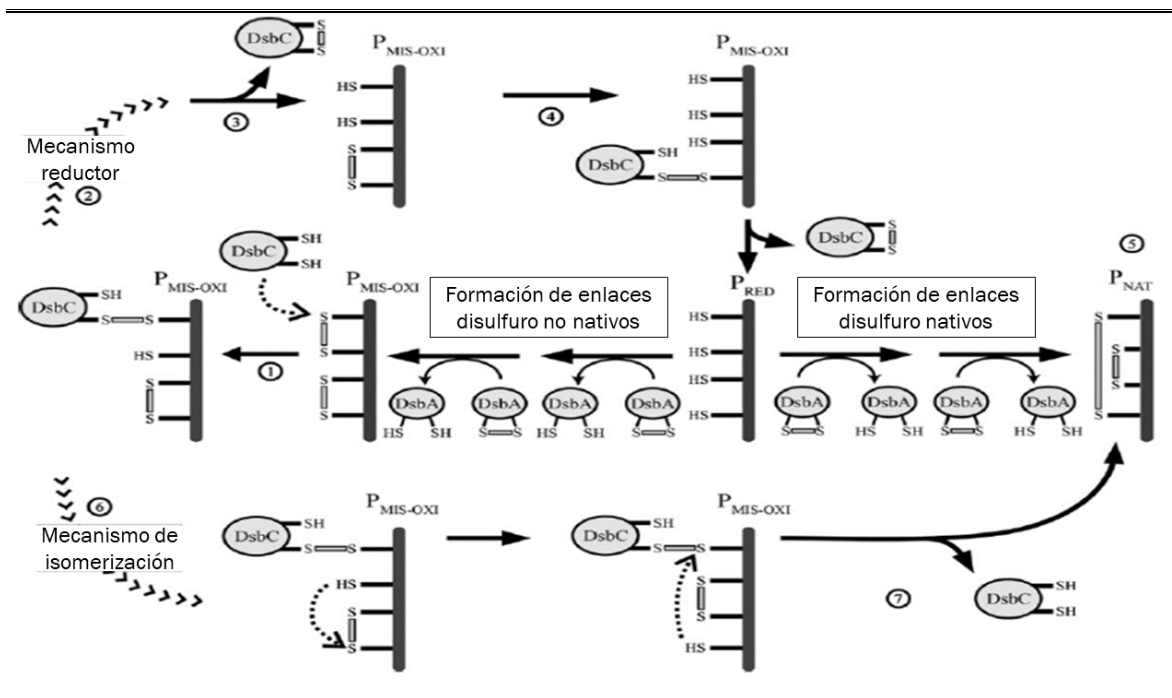


Figura 6. Posibles mecanismos de acción de la DsbC para la isomerización de enlaces disulfuro. Pred indica la proteína sustrato reducida, Pnat a la proteína en su forma nativa y Pmis-oxi la proteína oxidada. Del centro hacia arriba se representa el mecanismo de reducción y hacia abajo el mecanismo de isomerización. En el mecanismo de reducción DsbC reduce la proteína sustrato liberando los dos residuos de cisteína reducidos; así, se da otra oportunidad a la DsbA para volver a oxidar las cisteínas. En el mecanismo de isomerización se forma un complejo DsbC-proteína, generándose un solo residuo de cisteína reducido que ataca uno de los enlaces disulfuro intra-proteína sustrato, dándose el cambio de conectividad. Se libera la enzima DsbC en su forma reducida. Imagen modificada de Berkmen (2012).

La DsbC debe estar en su estado reducido para actuar como isomerasa de los enlaces disulfuro no nativos que fueron formados por al DsbA[12]. Cuando una proteína presenta un plegamiento inapropiado por la formación de enlaces disulfuro incorrectos, presenta escasa o nula actividad, además de que puede formar agregados moleculares debido a que los residuos de aminoácidos hidrofóbicos pueden estar forzados a la exposición al medio acuoso[11].

El residuo de cisteína más reactivo de la DsbC (Cys98) ataca nucleofílicamente al enlace disulfuro formado en la proteína sustrato, generándose un complejo activado entre la proteína sustrato y la DsbC[12]. La forma en que se resuelve este complejo activado es mediante dos posibles mecanismos (Figura 6): el primero es un mecanismo de isomerización y el segundo es un mecanismo de reducción[11], [12].

En el mecanismo de isomerización (Figura 6), el tiol libre de la proteína sustrato (Pmis-oxi) ataca nucleofílicamente al otro enlace disulfuro presente en la proteína, dando lugar a uno de los enlaces nativos y liberando un segundo tiol libre, mismo que ataca nucleofílicamente el enlace disulfuro formado entre la proteína y la DsbC, generando el segundo enlace

disulfuro nativo dando lugar a la proteína nativa (Pnat) así como la liberación y regeneración de la proteína DsbC al medio[11], [12].

Por otro lado, en el mecanismo de reducción, es el segundo tiol de la DsbC quien dirige el ataque nucleofílico sobre el enlace disulfuro generado entre la DsbC y la proteína sustrato, liberándose la DsbC en su forma oxidada y la proteína parcialmente reducida. Esta forma de acción se repite para todos los enlaces disulfuro de la proteína sustrato, en donde se gasta un equivalente de DsbC por cada enlace tratado, Al final se libera la proteína en su forma totalmente reducida (Pred) lista para ser nuevamente oxidada por la DsbA[11], [12].

Sin embargo, en el trabajo de Rietsch y colaboradores reportado por Gleiter y Bardwell (2008), se ha comprobado que el mecanismo que más se adecua a los resultados experimentales es el mecanismo de reducción, otros autores también apoyan este mecanismo[12], [17]. La proteína DsbC oxidada debe de reducirse para adquirir nuevamente su actividad enzimática mediante la acción de una cuarta proteína: la DsbD, una proteína integral de membrana[11], [12], [17], [29].

La fuente de electrones que mantiene a la DsbC en su forma reducida proviene de la DsbD, quien a su vez los obtiene de la tiorredoxina del citoplasma, y esta del NADPH[11], [17]. El flujo de los electrones es mediado por una serie de reacciones de formación de enlaces disulfuro en los distintos dominios de la DsbD[17] (Figura 5). La DsbC transfiere su enlace disulfuro hacia los residuos Cys103 y Cys109 del dominio α de la DsbD, quienes a su vez lo transfiere a los residuos Cys461 y Cys464 del dominio γ , mediante un enlace formado entre los residuos Cys461 y Cys109. Finalmente, el dominio β que está inmerso en la membrana recibe el enlace disulfuro en los residuos Cys163 y Cys285; a su vez, el enlace se transfiere a la tiorredoxina del citoplasma, quien es reducida por el NADPH[17].

Proteína DsbC

La DsbC es una proteína homodimérica con dos subunidades de 23.3 kDa; cada subunidad posee cuatro residuos de cisteína; sin embargo, solo dos de ellos (Cys98 y Cys101) se presentan en el dominio catalítico CXXC[17], donde los residuos intermedios son glicina y tirosina[30], [35]. El residuo Cys98 es altamente reactivo debido a que presenta un pKa muy bajo (aproximadamente 3.5), así que su forma reducida es estabilizada por el residuo Arg125, que se encuentra posicionado frente al sitio activo[17].

La proteína presenta una forma de “V” (Figura 7A), donde cada brazo está constituido por una subunidad y cada subunidad consiste en dos dominios: un dominio en la región carboxilo terminal con plegamiento tipo tiorredoxina y otro dominio de dimerización en la región amino terminal. El dominio amino terminal consiste en seis hebras β antiparalelas que están flanqueadas en la región cóncava por una α -hélice (representada en color naranja); el dominio carboxilo terminal presenta un plegamiento tipo tiorredoxina y contiene el sitio activo CXXC, representado en color verde[17]. El dominio de la región amino terminal o dominio de dimerización se compone predominantemente por residuos hidrofóbicos, dando este carácter a la abertura que se forma en la proteína completa[11], [17].

La dimerización de la DsbC es promovida por la formación de puentes de hidrógeno entre las hojas del dominio de dimerización[36]. La forma de “V” de la proteína es crucial para que actúe como isomerasa, así se protege el sitio activo de la acción de la DsbB; de lo contrario, el sitio activo de la misma estaría propenso a ser oxidado por la DsbB, eliminando en su totalidad su actividad de isomerasa[17]. Además, la estructura en “V” de la enzima tiene la capacidad de adoptar dos conformaciones: una abierta y otra cerrada. Esta propiedad confiere a la DsbC la flexibilidad necesaria para actuar sobre diferentes sustratos[29].

La DsbC también presenta actividad de chaperona[11], [12], [17]. Actúa sobre proteínas desnaturalizadas, impidiendo su agregación durante su replegamiento[37]. La capacidad de esta proteína para formar enlaces disulfuro estables con otras proteínas le provee su capacidad de chaperona[29].

Resultado de un estudio de proteómica sobre las proteínas que son exportadas al periplasma de *Escherichia coli* y que poseen cisteínas en su secuencia primaria, se encontró que más de 300 proteínas son sustratos potenciales del sistema de enzimas Dsb[38], [39]. Dutton reportó un análisis bioinformático que confirmó el uso del sistema Dsb en varios sustratos[40]. Cuando una proteína que posee cisteínas es exportada al periplasma de *Escherichia coli*, la DsbA actúa sobre la cadena polipeptídica naciente. Como consecuencia, se forman los enlaces disulfuro en función de su ocurrencia en el periplasma, a estos enlaces disulfuro se les conoce como consecutivos[11]. Sin embargo, hay algunas proteínas que poseen enlaces disulfuro no consecutivos; cuando la DsbA actúa sobre ellos, el resultado son proteínas con enlaces disulfuro no nativos. Estas son las proteínas que son sustrato de DsbC. Algunos ejemplo son la endorribonucleasa periplasmática RNasa I, la penicilin-insensitiva murina endopeptidasa MepA, la fosfatasa ácida periplasmática AppA y la endonucleasa-1 periplasmática End1[41]. Un caso particular es la fosfatasa acida periplasmática AppA, que se ha demostrado es dependiente de DsbC para su correcto plegamiento *in vivo*[42].

Proteína DsbG

La DsbG es una proteína homodimérica, cuya secuencia de aminoácidos es 49% similar y un 24% idéntica con DsbC [10],[12], [17], [29], [34]. Su estructura es similar a la DsbC (Figura 7B), las únicas diferencias son la extensión de los brazos de la “V”, que son más largos, y el interior de la cavidad, que es menos hidrofóbico[11], [17], [29]. Esta enzima es cerca de cuatro veces menos abundante que la DsbC[17], aunque presenta básicamente la misma actividad enzimática que la DsbC en relación con la capacidad isomerasa[11], [17], [29], [34], esta enzima presenta un rol más importante como reparadora del daño oxidativo[11], [12]. El daño oxidativo es causado por compuestos altamente oxidantes (especies reactivas de oxígeno) que atacan deliberadamente cualquier proteína, provocando que los residuos de cisteína sean oxidados hasta formar ácido sulfénico o hasta ácido sulfónico[11], [12].

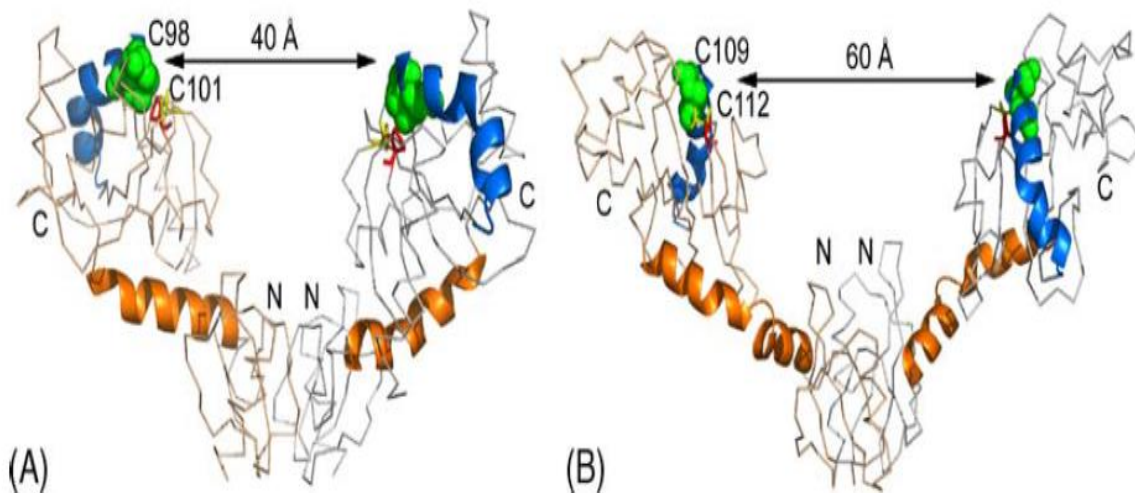


Figura 7. Plegamiento tridimensional de las proteínas DsbC (A, PDB 1EEJ) y DsbG (B, PDB 1V58). Las C y N indican las regiones carboxilo y amino terminales respectivamente. En color naranja está representada la α -hélice que une ambos dominios, en la DsbG hay una segunda α -hélice (en color naranja más oscuro) que provoca un aumento en el tamaño de la abertura de la proteína. El sitio activo está de color verde. Para la DsbC, los residuos *cis*-Pro183 y Thr182 son de color rojo y amarillo, respectivamente; en la DsbG, los mismos colores representan a los residuos *cis*-Pro201 y Thr200, respectivamente. Imagen modificada de Messens y Collet (2006)

La estructura de DsbG es diferente a DsbC en el dominio de dimerización, donde hay una segunda α -hélice, representada en naranja fuerte en la figura 7B[17]. Esta estructura la hace 2.5 vueltas más larga que la DsbC; además varios de los residuos presentes en la superficie de la cavidad son ácidos, con carga negativa, provocando que la cavidad sea de un carácter menos hidrofóbico[17], [29].

El sitio activo de DsbG es similar al de DsbC, localizado en el dominio con plegamiento tipo tiorredoxina y de tipo CXXC en los residuos Cys109 y Cys112, estos residuos son mantenidos en su forma reducida por los residuos *cis*-Pro201 y Thr200[17]. Esta proteína también es reducida por acción de la DsbD[17], [34].

Proteína DsbD

La DsbD es una proteína inmersa en la membrana interna compuesta por tres dominios[12], [17], cuya función principal es la de volver a reducir a las DsbC y DsbG[11], [12], [17], [29]. Sin embargo, la DsbD también se encarga de mantener los residuos de cisteína de la apocitocromo C en su forma reducida, permitiendo que se enlace apropiadamente con el grupo hemo[43].

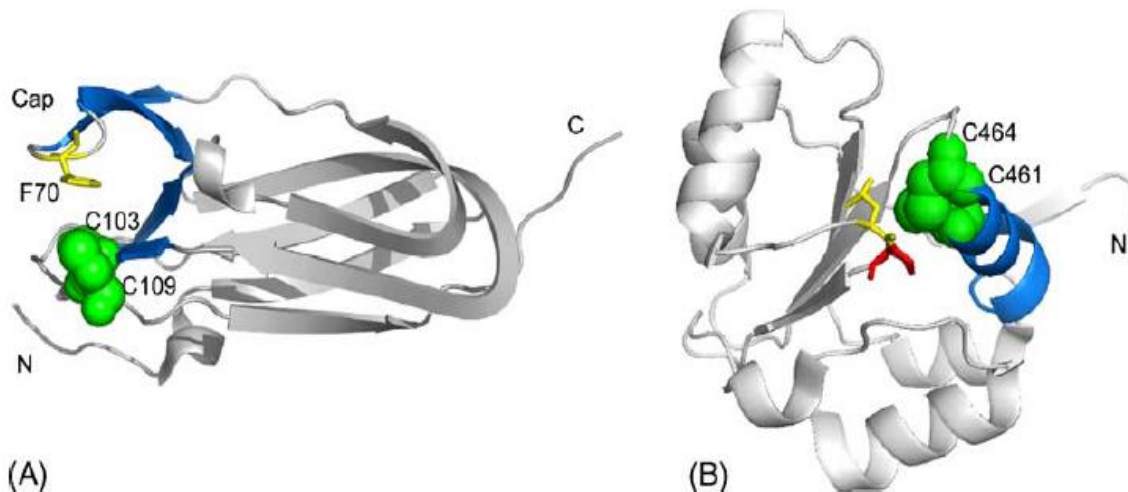


Figura 8. Plegamiento tridimensional de los dominios solubles de proteína DsbD. Las esferas verdes representan las cisteínas de los sitios activos. A) Representación del dominio DsbDa en donde el segmento en amarillo indica la ubicación del residuo Phe70, PDB 1JZD B) Representación del dominio DsbD γ , PDB 1UC7. Imagen modificada de Messens y Collet (2006)

La DsbD está compuesta por tres dominios: un dominio transmembranal DsbD β , flanqueado por los dominios DsbD α y DsbD γ en las regiones amino y carboxilo terminal, respectivamente (Figura 8)[12], [17]. El dominio DsbD α (Figura 8A) presenta un plegamiento tipo inmunoglobulina con un sitio activo compuesto por los residuos Cys103 y Cys109, que forman un enlace disulfuro entre dos hebras β . Este enlace es protegido del medio por el residuo Phe70, representado en color amarillo[17]. El dominio DsbD γ (Figura 8B) presenta un plegamiento tipo tiorredoxina con un sitio activo tipo CXXC entre los residuos Cys461 y Cys464[17].

La transferencia de electrones es mediada por reacciones de intercambio de enlaces disulfuro. El enlace formado en la DsbC (o DsbG) es transferido a la DsbD, al dominio DsbD α en los residuos Cys103 y Cys109. Posteriormente se transfiere al par Cys461 y Cys464 del dominio DsbD γ , mediado por el enlace entre los residuos Cys461 y Cys109. Después es el par Cys163 y Cys285 del dominio DsbD β quien recibe el enlace disulfuro. Finalmente es la tiorredoxina quien recibe el enlace disulfuro[12], [17].

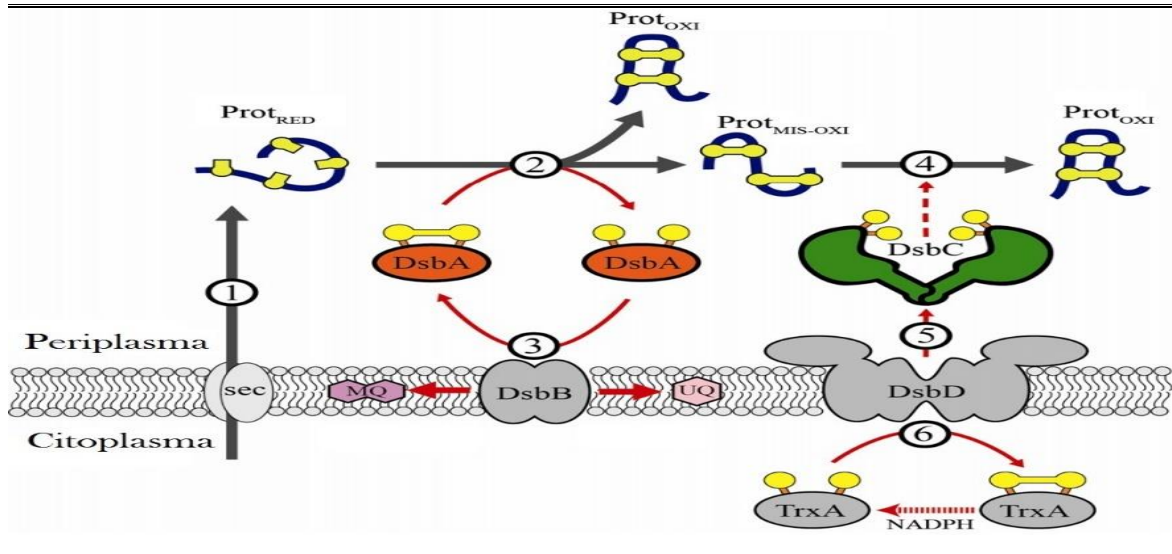


Figura 9. Oxidación de cisteínas en el periplasma de *Escherichia coli*. 1) Las proteínas destinadas a formar enlaces disulfuro son exportadas al periplasma mediante el translocon SecYEG, la proteína es exportada en su forma reducida (Prot_{RED}). 2) La DsbA forma el enlace disulfuro en la proteína recién exportada por reducción secuencial de dos cisteínas en su sitio activo, generando la forma oxidada de la proteína (Protoxi). 3) La DsbA es oxidada a su forma activa mediante la proteína integral de membrana DsbB, misma que dona los electrones recibidos a través de la ubiquinona (UQ), en condiciones aerobias, o por la menaquinona (MQ) en condiciones anaerobias. 4) En caso de una oxidación en la proteína blanco que exponga residuos hidrofóbicos al medio (Prot_{MIS-OXI}), la DsbC se encarga de reducir la proteína para que la DsbA tenga una nueva oportunidad para producir la oxidación que exponga la menor cantidad de residuos hidrofóbicos. 5) La DsbC recupera su forma reducida por transferencia directa de electrones de la DsbD, otra proteína integral de membrana. 6) La DsbD recibe los electrones de la tiorredoxina del citoplasma. Imagen adaptada de Berkman (2014).

La imagen 9 resumen y muestra en tu totalidad el sistema enzimático relacionado con la formación de enlaces disulfuro en *Escherichia coli* (Dsb). Resultado del estudio de los sistemas enzimáticos que están involucrados en la formación de los enlaces disulfuro, se ha aprovechado esta información para proponer métodos de sobreexpresión o de repliegamiento *in vitro* de proteínas recombinantes cuya estructura está estabilizada por enlaces disulfuro y que son particularmente de difícil expresión.

Repliegamiento *in vitro* asistido por enzimas

La versatilidad que ofrece el uso de las enzimas con actividad de oxidoreductasa sobre los enlaces disulfuro se ha ido ampliando, mostrando que las enzimas propias del periplasma de *Escherichia coli* pueden actuar sobre prácticamente cualquier proteína que contenga cisteínas disponibles para oxidarse. Bajo las condiciones adecuadas, la DsbA ha sido usada para oxidar los enlaces disulfuro de una proteasa y de una RNasa[3], aunque también se empleó para reducir los enlaces disulfuro de la insulina[2]. La DsbC se ha utilizado en el repliegamiento de una proteína que forma cinco enlaces disulfuro[1]. Sin embargo, la actividad de estas enzimas no se limita al repliegamiento *in vitro*, también han asistido el

método de expresión *cell-free*, favoreciendo la expresión de proteína soluble al contribuir en la formación de los enlaces disulfuro de forma acoplada a la síntesis de la cadena polipeptídica[4]. Cabe mencionar que la aplicación simultánea de las enzimas DsbA y DsbC en el replegamiento *in vitro* del fragmento [24-152] la proteína doppel humana hDpl no mostró una ganancia significativa en tiempo o cantidad de proteína replegada exitosamente en comparación con la utilización de las enzimas por separado[44].

Por otro lado, el estudio del mecanismo de plegamiento de una proteína en el organismo de origen ha proporcionado información suficiente para desarrollar métodos de replegamiento *in vitro* asistido por las enzimas que intervienen naturalmente en el plegamiento. El estudio más claro se hizo sobre una toxina de cono de mar[45]; en esta investigación se evaluó el efecto individual y colectivo de tres enzimas que intervienen en el plegamiento natural dentro del retículo endoplasmático de *C. novaehollandiae*. Las enzimas estudiadas fueron PDI (oxidoreductasa e isomerasa de enlaces disulfuro), PPI B (peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa) y BiP (chaperona). El resultado fue la toxina con el plegamiento nativo cuando las tres enzimas actúan simultáneamente.

Además, un estudio similar usando la maurotoxina del alacrán *Scorpio maurus palmatus* y enzimas parecidas a las presentes en el mismo organismo para el replegamiento *in vitro* mostraron un resultado muy parecido al estudio con la toxina de cono de mar, favoreciéndose el plegamiento nativo[5].

La enzima DsbC de *Escherichia coli* es de particular interés para usarse en el replegamiento de proteínas estabilizadas por enlaces disulfuros, debido a su diversidad de funciones, como reductasa[36], [37], [46], [47], isomerasa de enlaces disulfuro[36], [48] y como chaperona[11], [12], [17],[36], [48].

Sustratos para rDsbC

Los posibles sustratos para medir la participación de DsbC en el replegamiento de proteínas estabilizadas por enlaces disulfuro deben cubrir las siguientes características: fácil obtención de cantidades suficientes para hacer todos los estudios pertinentes de actividad, poseer al menos tres enlaces disulfuro, desnaturalizarse con facilidad y que el replegamiento espontáneo tenga una cinética lenta.

Así, primero se propusieron las toxinas tamapina [49] y Tx1 [6]; péptidos previamente trabajados y estabilizados por enlaces disulfuro. No obstante, la tamapina mostró ser inadecuada debido a que el estado desplegado producido recuperó su plegamiento nativo prácticamente al inicio del estudio, mostrando una cinética de replegamiento rápida. Por otro lado, la toxina Tx1 ofreció problemas de purificación por la presencia de dos especies estables después de la purificación y el bajo rendimiento de purificación.

Como alternativa a las toxinas propuestas y en función de los sustratos previamente usados en la literatura, la lisozima cumple con las características necesarias como sustrato idóneo [37], [50], [51]. Además, es posible medir la actividad de la enzima después del ensayo de replegamiento mediante la actividad lítica sobre *Micrococcus luteus* [52], [53].

La lisozima purificada de la clara de huevo de gallina es una proteína cuya actividad lítica está determinada por los residuos Asp52 y Glu35[52], [54]. Además, los cuatro enlaces disulfuro contribuyen a mantener una superficie electrostática positiva [53], que se sugiere participa en el primer paso de unión a la pared bacteriana antes de hidrolizar los enlaces $\beta(1-4)$ de oligosacáridos con N-acetilglucosamina [52], [53]. Se observó una mejor recuperación de la actividad lítica cuando se renaturaliza con DsbC en comparación con PDI [37]. No obstante, se debe considerar que las proteínas pueden desnaturalizarse irreversiblemente cuando hay modificaciones covalentes sobre determinados residuos [55]. El ácido aspártico puede racemizarse a asparagina [56], la asparagina puede sufrir desaminación y también puede eliminarse el grupo tiol de las cisteínas[57].

Toxina Ts16

Ts16 constituye uno de los componentes proteicos del veneno del alacrán *Tytus serrulatus*, especie endémica de Brasil. La cadena polipeptídica de Ts16 se compone de 29 aminoácido que adquieren una conformación estructural tipo hélice-asa-hélice, propia de la familia de toxinas κ -KTx. Dicha estructura se estabiliza por la formación de tres enlaces disulfuro; cuya conectividad entre los residuos de cisteína es C2-C24, C7-C20, C11-C26. La figura 10A presenta la estructura resuelta por RMN de Ts16 [7].

Debido a que el diseño experimental contempla la proteólisis de la proteína de fusión con la proteasa trombina, que libera la toxina Ts16 con dos residuos de aminoácido adicionales (glicina y serina (GS)), se opta por nombrar a este producto de liberación como GS-Ts16.

La GS-Ts16 ha sido biosintetizada previamente en *Escherichia coli* por Saucedo (2012) utilizando el sistema de expresión pET. El gen de la toxina optimizado para la expresión en *Escherichia coli* fue subclonado en el plásmido pET32(a), que genera una proteína de fusión con tiorredoxina. El rendimiento final de expresión y purificación de GS-Ts16 fue de 0.56 mg por litro de medio de cultivo [7].

Es particularmente relevante resaltar que la expresión heteróloga de este péptido en *Escherichia coli* con el plásmido pET32a genera dos isoformas en semejante cantidad, como lo muestra el cromatograma de fase reversa (Figura 10C). Adicionalmente, los datos de espectrometría de masas de estas dos isoformas demuestran que se trata del mismo péptido. La diferencia entre ambos péptidos recae en la conectividad de los enlaces disulfuro, siendo la isoforma con menor tiempo de retención en la columna de fase reversa la isoforma nativa.

Determinar un método de replegamiento que favorezca la estructura nativa con respecto a la segunda especie estable no nativa es fundamental para continuar el estudio de péptidos con comportamiento semejante, como la toxina Tx1. Con la potencial aplicación del método en péptidos cuya expresión heteróloga en *Escherichia coli* es muy complicada por la formación de agregados insolubles, de los cuales hay que proseguir con experimentos de replegamiento, como son las defensinas.

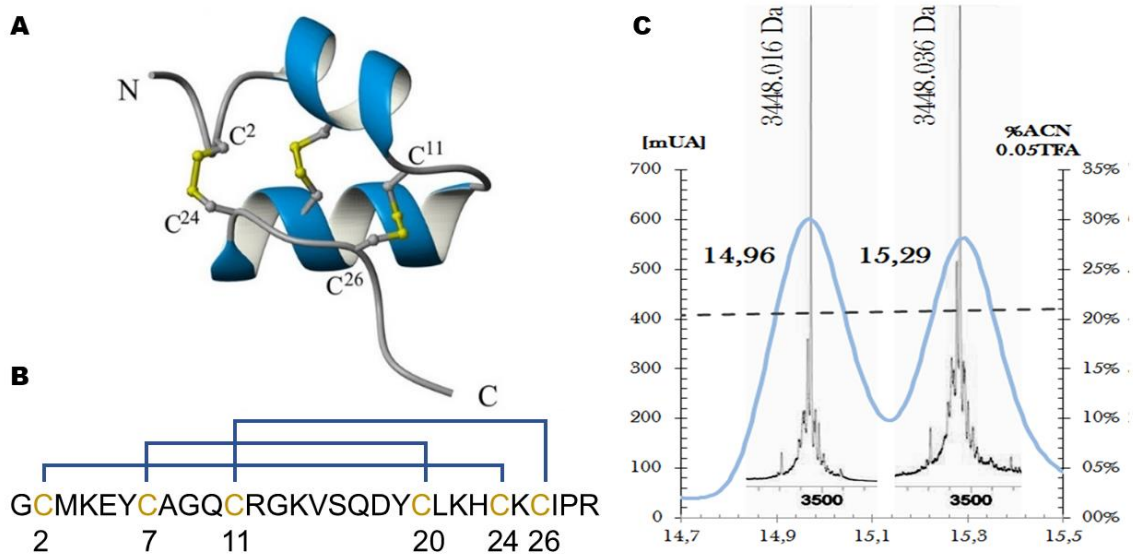


Figura 10. Toxina Ts16. A) Estructura elucidada por RMN de GS-Ts16 (PDB 2L07). La estructura presenta un motivo tipo hélice-asa-hélice, característico de la familia de toxinas κ -KTx, estabilizado por tres enlaces disulfuro; las letras N y C indican las regiones amino y carboxilo terminal, respectivamente. B) Secuencia primaria del péptido. Se muestra la conectividad de cisteínas. C) Purificación por cromatografía de fase reversa y espectros de masas MALDI-TOF. Las dos bandas que se muestran corresponden con las dos isoformas de la toxina GS-Ts16 producidas en la expresión heteróloga en *Escherichia coli*, los datos de masa molecular corroboran que se trata del mismo péptido. Imagen modificada de Saucedo et al., (2012)[6].

Hipótesis

El uso de DsbC recombinante (rDsbC) ayudará a que la toxina GS-Ts16 de *Tytus serrulatus* adquiera el plegamiento reportado por Saucedo (2012) en el replegamiento *in vitro*.

Objetivo principal

Mejorar el rendimiento en el replegamiento correcto de la toxina GS-Ts16 mediante el uso de la enzima rDsbC.

Objetivos particulares

- ❖ Expresar y purificar el péptido GS-Ts16.
- ❖ Expresar y purificar la enzima rDsbC.
- ❖ Caracterizar estructuralmente y evaluar la actividad enzimática de rDsbC.
- ❖ Evaluar el efecto de adicionar rDsbC en el replegamiento del péptido GS-Ts16.

Materiales y métodos

Producción recombinante de DsbC

El plásmido pET40b-DsbC se construyó por mutagénesis sitio-dirigida sobre el plásmido pET40b (*Novagen*). La amplificación se hizo con una ADN polimerasa de alta fidelidad (*AccuPrime Pfx DNA Polymerase, Invitrogen*) y con los siguientes oligonucleótidos: 40b-Fwr 5'-CAG CGG TTT CTT ACA TAC CAA TTG CAG TAC- 3' y 40b-Rvs 5'-GCA ATT GGT ATG TAA GAA ACC GCT GC- 3'. La mutación que inserta un codón de paro después de la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal de la DsbC se muestra subrayada. La condición de amplificación se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de amplificación por PCR para mutagénesis sitio-dirigida en pET40b

Medio de reacción (μL)		Programa de calentamiento		
Composición		Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Molde (pET40b) 44.7 ng/μL	0.5	Desnaturalización inicial	95	120
Primers 40b-Fwr/40b-Rvs 10 mM	1.0 c/u	Desnaturalización	95	15
Amortiguador 10X	2.0	Alineamiento	65	30
AccuPrime Pfx DNA pol (<i>Invitrogen</i>)	0.4	Extensión	68	360
Agua grado MilliQ estéril	Cbp 20.0	Extensión final	68	300
		No. de ciclos	25	

Se comprobó la presencia del amplicón en la reacción de PCR con un gel de agarosa al 0.8%. El plásmido amplificado se purificó usando el protocolo descrito por QIAGEN (*QIAquick PCR Purification Kit using a Microcentrifuge, QIAGEN*) y se sometió a digestión con la enzima de restricción DpnI, durante 3 h a 37°C. El producto final se purificó usando el protocolo de *QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)* y se usó para amplificación bacteriana en la cepa *DH5α*. Se extrajo y purificó plásmido de un cultivo de 50 mL incubado a 37°C por 16 h generado a partir de una colonia de *DH5α* transformante. Se comprobó la integridad del plásmido purificado con un gel de agarosa al 0.8% y se solicitó la secuenciación de la región río abajo del T7 terminador a *Laragen Inc.*

Adicionalmente, se hizo un ensayo de expresión sobre las muestras de plásmido secuenciado usando la cepa *BL21 DE3* como hospedero. Se prepararon muestras de cultivos inducidos con 0.5 mM IPTG por 8 h a 37°C y se lisaron por sonicación (3 pulsos de 75 watts de potencia por 15 s con descansos entre pulsos de 30 s) y se separó la fracción soluble por centrifugación a 13,000 rpm por 15 min. Las fracciones solubles se prepararon para electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante al 12%.

Para la expresión de rDsbC, se transformó por choque térmico una alícuota de *BL21 DE3* competente con el plásmido pET40b-DsbC. A partir de una colonia de la caja de células transformantes, se preparó un cultivo semilla en 150 mL de medio LB con kanamicina (30 μg/mL) a 37°C por 16 h. El cultivo semilla se usó para inocular 1.5 L de medio LB por dilución 1:75, el cultivo se incubó a 37°C hasta alcanzada una densidad óptica a 600 nm (OD_{600nm}) entre 0.7 - 0.8. La temperatura se ajustó a 30°C y se indujo con IPTG (0.5 mM, concentración final). La expresión continuó por 8 h.

La biomasa se cosechó por centrifugación a 4,000 rpm por 10 min y se resuspendió en amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0) en una relación de 20 mL por cada gramo de biomasa. Se sonicó usando 75 watts de potencia durante 10 s y 30 s de descanso entre pulsos hasta completar 10 min de tratamiento total. El lisado celular se aclaró por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min.

La enzima se purificó por cromatografía de afinidad metal quelato con una columna *HisTrap (GE)*, previamente equilibrada con amortiguador de equilibrio (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 8.0). La proteína fue eluída con un gradiente escalonado de imidazol (25, 300 y 500 mM) y se comprobó la ubicación de la proteína entre las fracciones colectadas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15 %.

La fracción de interés fue desalada por diálisis. Se usó una membrana de 10 kDa contra un amortiguador de cambio (50 mM Tris-HCl pH 8.0) en una relación volumétrica de 1:100. Se realizaron dos cambios de amortiguador de cambio en intervalos de 6 h a temperatura ambiente hasta completar 12 h de diálisis. La mezcla proteica recuperada fue cuantificada por espectrofotometría a 280 nm usando ϵ_{280} 17,670 M⁻¹cm⁻¹ (estimado por ExPASy-ProtParam [58]). La rDsbC se caracterizó por Espectrometría de Masas MALDI-TOF y por Dicroísmo Circular.

Caracterización de rDsbC

Los experimentos de Dicroísmo Circular se obtuvieron siguiendo las recomendaciones de Kelly (2005)[59] en un espectropolarímetro Jasco J-1500 acoplado a un sistema de control de temperatura Peltier (Jasco PCT-517). La muestra se concentró por ultrafiltración con un filtro Vivaspin 20 de 10 kDa (Satorius) a 6,000 rpm en etapas de 10 min hasta reducir el volumen en cerca de 5 veces. Se determinó la concentración de la muestra por espectrofotometría usando el método antes descrito. Para obtener el espectro de Dicroísmo Circular, la muestra se diluyó con agua desionizada grado MilliQ hasta una concentración de 7 μ M; se usó como blanco una preparación semejante sustituyendo la disolución proteica por amortiguador de diálisis. El espectro se obtuvo haciendo un barrido de longitud de onda desde 260 nm hasta 190 nm en intervalos de 1 nm y una velocidad de 20 nm/min. Los espectros se obtuvieron por triplicado y se sustrajo la señal del blanco. Finalmente, los datos obtenidos se procesaron de acuerdo a lo estipulado por Kelly (2005)[59].

Producción recombinante de GS-Ts16.

Se siguió el mismo protocolo antes descrito para la expresión y purificación de la proteína de fusión Trx-Ts16, usando el plásmido pET32a-Ts16[6] en la cepa *BL21 DE3*. La proteína de fusión Trx-Ts16 purificada se sometió a digestión enzimática con trombina de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (*Sigma-Aldrich*). La reacción se mantuvo en agitación por inversión a temperatura ambiente por 3 h.

Después de separar la trombina de la mezcla de proteólisis, se procedió a un segundo paso de cromatografía de afinidad metal-quelato con la columna *HisTrap (GE)* previamente equilibrada con amortiguador de equilibrio (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 8.0), dejando recircular por 2 h. El eluato de la columna se concentró y desaló por extracción en fase sólida con la columna Strata C18-T (*Phenomenex*), siguiendo las indicaciones del fabricante. La toxina GM-Ts16 se eluyó de la columna con acetonitrilo al 60 % (v/v); ésta fracción se congeló y se liofilizó.

El material liofilizado se preparó para un último paso de purificación por cromatografía de Líquido de Alta Eficiencia acoplado a una columna de Fase Reversa (en lo sucesivo CLAE-FR). La columna de fase reversa usada fue una C12 (*Jupiter Proteo, Phenomenex*) en un programa de elución con

pendiente de 1.0 mL min⁻¹ entre 20% y 30% de acetonitrilo. La columna se mantuvo a 30°C y la detección se hizo por espectrofotometría a 230 nm. Se colectaron los picos más abundantes de cada corrida cromatográfica y se liofilizaron. Todas las muestras se caracterizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF, por espectroscopia ¹H-RMN. Se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm usando ϵ_{280} 3,355 M⁻¹cm⁻¹ (estimado por ExPASy-ProtParam; [58]).

Los experimentos de protón de Resonancia Magnética Nuclear se obtuvieron en un equipo Varian de 500 MHz. Las muestras se resuspendieron en agua desionizada grado MilliQ con 5 % (v/v) D₂O a un volumen final de 375 µL. Los espectros se obtuvieron usando una secuencia de pulsos que suprime la señal del agua a 25°C.

Posterior a los análisis estructurales por Resonancia Magnética Nuclear y de Espectrometría de Masas MALDI-TOF se evaluó la pureza de las muestras por CLAE-FR. Se mantuvieron las mismas condiciones de separación que en la purificación, cambiando únicamente la pendiente del programa de elución a 1.25 mL min⁻¹ entre 25% y 45 % de acetonitrilo.

Evaluación de la actividad de rDsbC

Se eligió la lisozima como proteína sustrato para evaluar la actividad de la rDsbC purificada, adaptando los protocolos antes descritos[8], [42]. La lisozima liofilizada (*Merck*) se sometió a desnaturalización y reducción por 16 h en un amortiguador desnaturalizante (5 M urea, 100 mM DTT, 20 mM Tris-HCl, pH 9.0). La lisozima desnaturalizada se dializó por 8 h a temperatura ambiente, usando 20 mM ácido acético pH 3 como amortiguador de cambio en una relación 1:100. Después, la lisozima reducida y dializada se oxidó mezclando en una relación 1:1 la preparación proteica de lisozima y un amortiguador de oxidación (40 mM fosfatos, 0.1 mM CuCl₂, 4 mM H₂O₂, pH 7.5); esta mezcla de reacción se mantuvo a 37°C por 30 minutos. La lisozima oxidada no nativa se dializó contra 20 mM fosfatos pH 7.5 en una relación 1:100 por 12 h a temperatura ambiente. Finalmente se cuantificó la concentración de lisozima oxidada no nativa por espectrofotometría a 280 nm (ϵ_{280} 36,000 M⁻¹cm⁻¹, [52]).

A parte, la rDsbC se preparó para su uso como lo sugiere la literatura[8], [42]. La rDsbC se redujo en un amortiguador de reducción (50 µM rDsbC, 10 mM DTT, 20 mM Tris-HCl, pH 9.0) durante 10 min a temperatura ambiente. Después, se dializó por 16 h a temperatura ambiente, usando 20 mM ácido acético pH 3 como amortiguador de cambio en una relación 1:100. Se cuantificó la mezcla proteica por espectrofotometría a 280 nm usando ϵ_{280} 17,420 M⁻¹cm⁻¹ (Estimado por ExPASy-ProtParam; [58]).

La renaturalización de la lisozima se hizo adaptando el protocolo previamente descrito[8]. Se adicionó lisozima oxidada no nativa hasta una concentración final de 0.5 µM a una preparación amortiguada a pH 7.5 con 20 mM fosfatos en presencia y ausencia de 0.5 µM rDsbC reducida en un volumen total de 1.5 mL. Estas reacciones fueron denominadas como “Control” y “rDsbC”, respectivamente. La reacción prosiguió por 2 h a 37°C; al concluir el tiempo, se conservaron las reacciones a 4°C hasta su uso. Esta reacción se realizó por duplicado.

Adicionalmente, para demostrar que la rDsbC expresada muestra la actividad esperada se comparó con PDI comercial (*Sigma-Aldrich*). La lisozima oxidada no nativa se renaturalizó en presencia de 0.5 µM de PDI usando el amortiguador antes mencionado; la reacción prosiguió por 2 h a 37°C. Esta reacción se denominó “PDI”.

La actividad lítica de la lisozima se determinó por espectrofotometría a 600 nm usando *Micrococcus luteus* como sustrato (Ceparío del Departamento de Biología, Facultad de Química,

UNAM). Para todas las determinaciones y repeticiones, se usó un cultivo fresco de *Micrococcus luteus* incubado a 30°C por 48 h. La biomasa del cultivo fue separada por centrifugación a 6,000 rpm por 5 min y se resuspendió en 50 mM fosfatos, 20 mM NaCl, pH 7.5 en una relación de 25 mL de amortiguador por cada gramo de biomasa. El ensayo de actividad se realizó diluyendo la resuspensión celular en amortiguador antes mencionado hasta obtener una lectura de absorbancia a 600 nm entre 0.8 y 1.0; entonces, se adicionó la lisozima hasta una concentración final de entre 1 y 5 µM en un volumen total de 1.5 mL y se inició la recopilación de datos espectroscópicos en intervalos de 2 s hasta completar 2 min. Se empleó un experimento de control de actividad de la lisozima usando una muestra de lisozima nativa (preparada directamente del polvo liofilizado comercial), esta muestra fue denominada como “nativa”.

Para determinar la actividad enzimática, se usaron los datos correspondientes a los primeros 20 s de reacción, donde los datos se ajustan a un modelo lineal; cuya pendiente (determinada en [absorbancia min⁻¹]) se usa para calcular la actividad enzimática [U], donde 1 U es igual a 0.001 [absorbancia min⁻¹] [60]. Para calcular la actividad específica, se usó la cantidad de lisozima [mg] en la reacción de lisis determinada por espectrofotometría a 280 nm; quedando en unidades [U mg⁻¹] [52].

Para verificar que haya diferencia significativa entre los resultados de actividad específica de las muestras denominadas “nativa”, “control” y “rDsbC” se usó la prueba t de student para dos muestras independientes con igual tamaño de muestra y varianzas iguales [61]. Se utilizó un nivel de confianza del 95 % y se definió el tamaño de muestra n como 2. La hipótesis nula (H₀) se estableció como “no hay diferencia” y la hipótesis aleatoria (H_a) como “si hay diferencia”. El valor de “t” se calculó con las siguientes ecuaciones:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1 X_2} \sqrt{\frac{2}{n}}} \quad S_{X_1 X_2} = \sqrt{\frac{1}{2}(S_{X_1}^2 + S_{X_2}^2)}$$

Los valores de “t” calculado se compararon con el reportado en la tabla “t-Student” para alfa de 0.025 y 2 grados de libertad (4.3027). Si la “t” calculada es igual o menor se acepta la hipótesis nula H₀, si es mayor se rechaza y se acepta la hipótesis alterna H_a.

Renaturalización de GM-Ts16 asistida por rDsbC

Siguiendo el procedimiento usado para la lisozima, se procedió a desnaturalizar y oxidar la GM-Ts16 bajo las mismas condiciones usadas para la lisozima. La renaturalización se realizó adicionando GM-Ts16 oxidada no nativa hasta una concentración final de 10 µM a una preparación con y sin 10 µM rDsbC en 50 mM fosfatos a pH 7.5 en un volumen final de 300 µL. La reacción procedió por 2 h a 37°C, después se conservó a 4°C hasta su detección por CLAE-FR. La detección de las diferentes especies generadas por el tratamiento de renaturalización se realizó por cromatografía en fase reversa en una columna *Jupiter proteo (Phenomenex)*, se usó un programa de elución con pendiente de 1.25 mL min⁻¹ entre 25% y 45 % de acetonitrilo y la detección se hizo por espectrofotometría a 230 nm.

Por otro lado, se usó como sustrato de la rDsbC una muestra de Ts16 purificada con un plegamiento diferente al nativo. Por tener un plegamiento naturalmente diferente al nativo, no se sometió a desnaturalización y oxidación previa; se usó directamente en la reacción de renaturalización. La detección de especies también se siguió por cromatografía en fase reversa.

Efecto de la oxidoreductasa DsbC en el plegamiento de la toxina Ts16

Para comprobar que la toxina GS-Ts16, denominada como nativa, es la especie más estable cuando se somete la toxina al proceso de renaturalización, la toxina denominada como nativa se trató con y sin rDsbC adicionada. Después de mantener la interacción por 2 h a 37°C, las muestras se analizaron por CLAE-FR con el programa antes mencionado y se obtuvieron los espectros de masas MALDI-TOF.

Resultados

Expresión y purificación de rDsbC

Para la expresión de la enzima rDsbC se hizo una mutación puntual sobre el plásmido pET40b, que contiene la secuencia de la enzima de interés. Se sustituyó un codón posterior a la secuencia correspondiente a la etiqueta de histidinas *HisTag* por un codón de paro (TAA), aprovechando la secuencia para cambiar solamente un nucleótido; en este caso, una adenina por timina del codón de lisina, 15 aminoácidos después de la etiqueta de histidinas. La correcta amplificación se comprobó con un gel de agarosa cargado con una muestra de la amplificación previo a la digestión con DpnI (Figura 11 A). La flecha roja en la figura 11 A señala la banda que corresponde con el peso esperado para la amplificación del plásmido (6 kb), aunque hay que resaltar que la amplificación produjo otro producto con peso aproximado de 10 kb. Para evitar problemas subsecuentes por este producto indeseado, se purificó el plásmido directamente del gel de agarosa.

La secuenciación de la región anterior al T7 terminador confirma que la mutación fue exitosa (Figura 11 B). Adicionalmente, se hizo un ensayo de expresión en pequeña escala de rDsbC para las cuatro muestras enviadas a secuenciación, mismo que comprueba la mutación exitosa del plásmido pET40b por la presencia de la banda de la proteína esperada en 28.3 kDa (Figura 11 C).

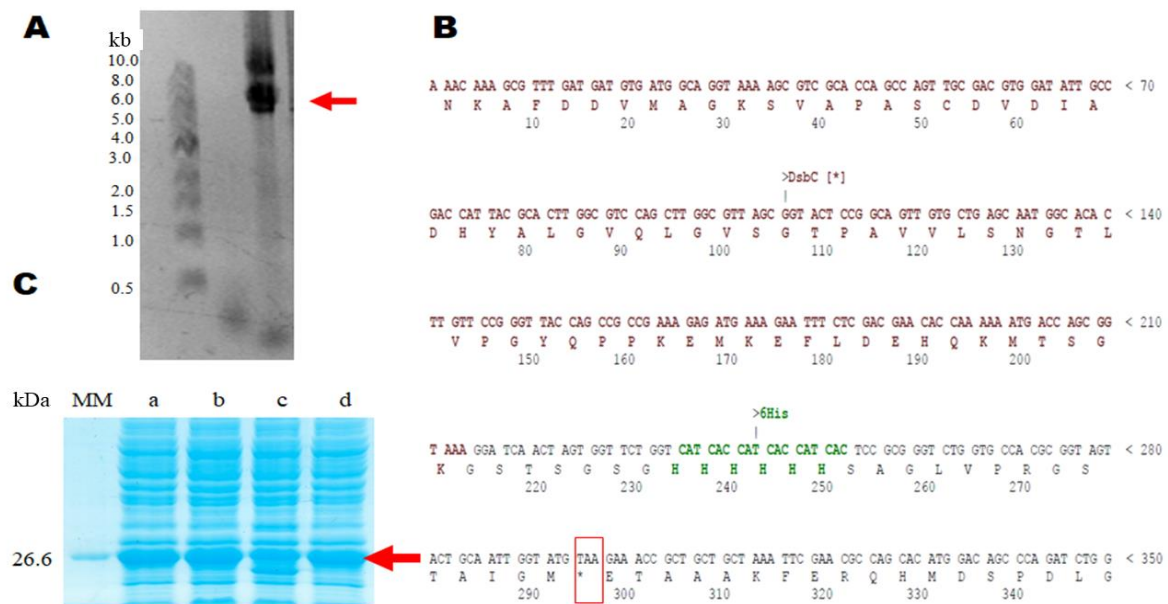


Figura 11. Construcción del plásmido pET40b-DsbC A) Amplificación por PCR del plásmido pET40b-DsbC. Marcador 1 Kb NEB y muestra de plásmido amplificado por PCR. La flecha roja indica la banda correspondiente con la amplificación esperada. Las muestras no han sido digeridas con DpnI. B) Secuenciación de la región río abajo del T7 terminador, mostrándose en café la región carboxilo terminal de DsbC, en verde la etiqueta HisTag y encerrado en un cuadro rojo el codón de paro. C) Gel SDS-PAGE 12 % del control de expresión de las cuatro muestras de plásmido secuenciado (a-d), cuya proteína se señala con una flecha roja y cuyo peso es de 28.3 KDa. Marcador Polypeptide BioRad.

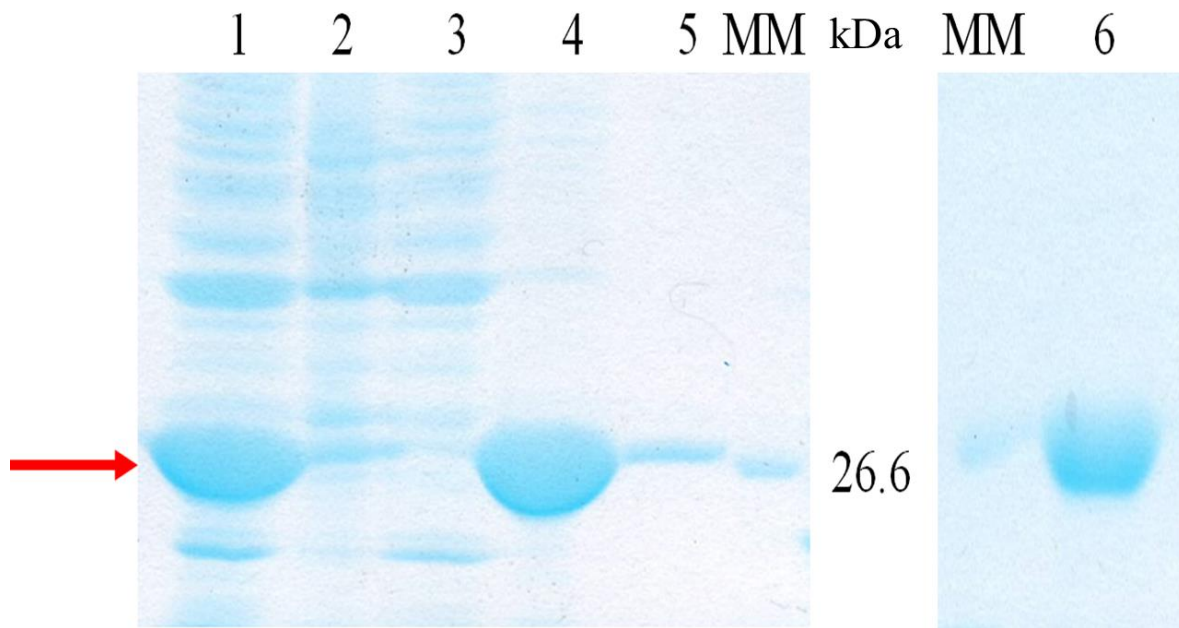


Figura 12. Expresión y purificación de rDsbC (28.3 KDa). Purificación de rDsbC, 1) fracción soluble del lisado celular, 2) fracción no retenida en la columna HisTrap (GE), 3) lavado con 25 mM imidazol, 4) elución con 300 mM imidazol, 5) elución con 500 mM imidazol, 6) fracción eluída con 300 mM imidazol dializada. Marcador Polypeptide BioRad.

Se dio un seguimiento a la purificación de la enzima rDsbC expresada en BL21(DE3) muestreando en cada paso de purificación. Las muestras colectadas se presentan en el gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15% migrado en amortiguador de tricina de la figura 12. La flecha roja señala la banda que corresponde con el peso esperado para la enzima rDsbC (28.3 KDa); es evidente la reducción de otras proteínas con peso molecular diferente hasta la muestra colectada después del proceso de diálisis. El rendimiento final fue de 0.7 mg L⁻¹ de cultivo.

Una vez obtenida la enzima rDsbC purificada, se obtuvieron los espectros de masas MALDI-TOF y de Dicroísmo Circular. El espectro de Dicroísmo Circular muestra los mínimos de 218 nm y 208 nm, característicos de una proteína plegada con predominio de hélices α . El espectro se comparó con uno obtenido de la literatura [8], [62], observándose el espectro esperado (Figura 13 A y B). Cabe resaltar que la diferencia en intensidad de la señal se debe a la diferencia de concentración de DsbC en cada experimento, el experimento de referencia es casi tres veces más concentrado. El espectro de Masas MALDI-TOF de la proteína purificada muestra una señal a 26,404 Da (flecha roja) que concuerda con la masa calculada (26,114 Da [58]). Entonces, la rDsbC purificada muestra el plegamiento esperado; sin embargo, aun presenta algunos contaminantes en disolución.

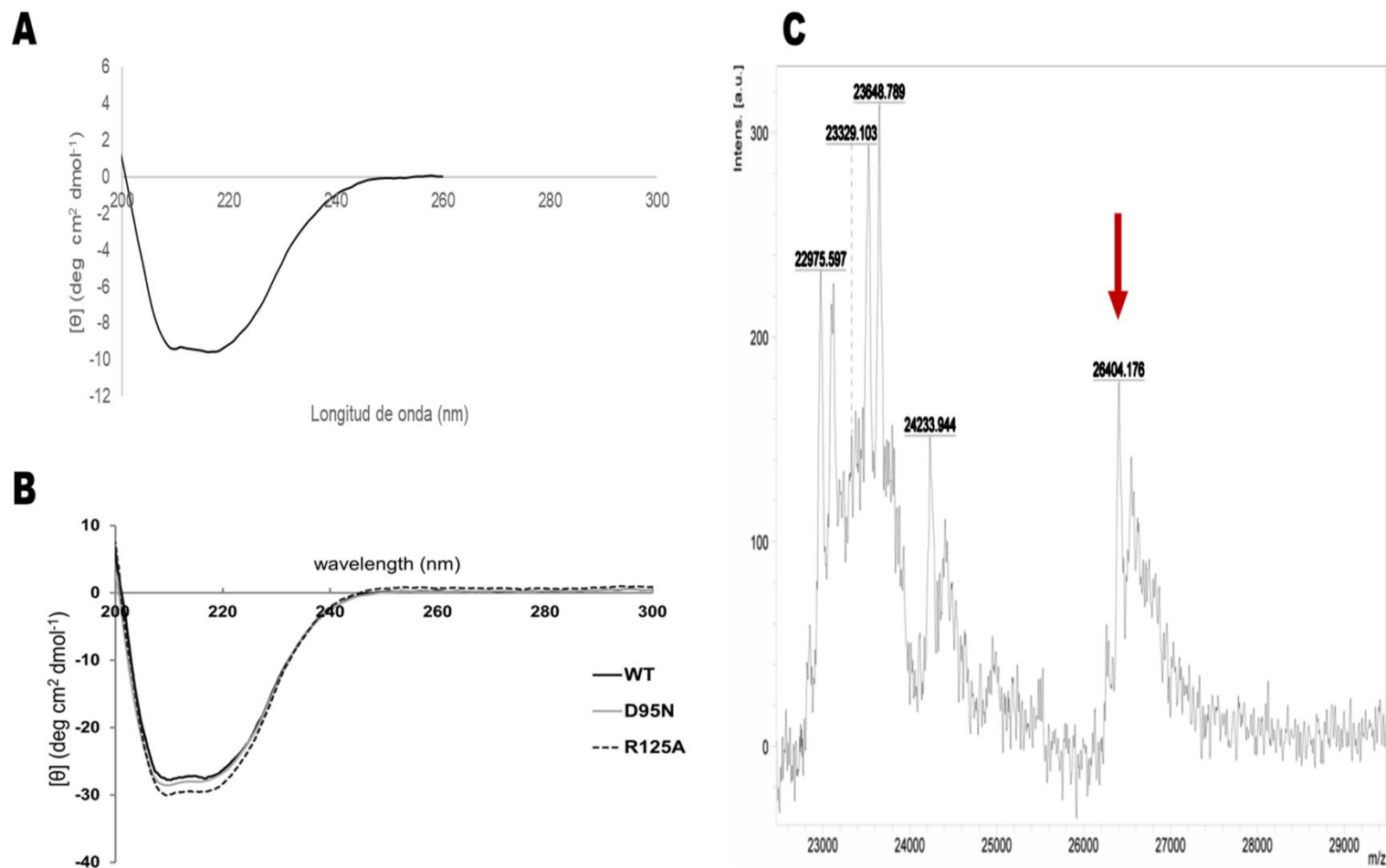


Figura 13. Caracterización de rDsbC purificada. A) espectro de Dicroísmo Circular de rDsbC (0.17 mg/mL en 16 mM Tris-HCl, pH 8.0) a 20°C. B) espectro de Dicroísmo Circular de DsbC recombinante tomado de Jiao (2013)²⁶, (23 μM (0.6 mg/mL) en 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 15 mM NaCl, 2-mercaptoetanol) a 22°C C) espectro de masas MALDI-TOF de rDsbC, matriz de ácido sinapínico en relación 1:5.

Expresión y purificación de GS-Ts16

Se monitorio el proceso de purificación y digestión enzimática de la proteína de fusión Trx-Ts16 colectando muestras entre cada paso del proceso. Las muestras se presentan en el gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15 % migrado en amortiguador de Tricina mostrado en la figura 14. La flecha roja señala la banda que corresponde con la masa molecular de la proteína de fusión Trx-Ts16, con masa de 20 KDa, en los pasos previos a la digestión enzimática. La flecha azul indica la banda que corresponde con el residuo de corte después de la digestión enzimática de Trx-Ts16 (17 KDa), indicativo de que se obtuvo el péptido GS-Ts16. La purificación del péptido GS-Ts16 continuo por CLAE-FR y las fracciones colectadas se liofilizaron para su posterior análisis por espectroscopía $^1\text{H-RMN}$ y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los espectros de masas de las especies denominadas A (13.5 min) y B (14 min) generaron espectros de masas limpios (Figura 15). Por otro lado, las especies denominadas como C (17 min) y D (17.5 min) muestran varios fragmentos; así que fueron descartados. Con respecto a las especies 15A y 15B, se pueden observar las señales correspondiente a las relaciones 1:1 m/z y 1:2 m/z con masas de 3451 Da y 1726 Da, respectivamente (Figura 15, A y B), congruentes con la masa esperada de acuerdo con el trabajo previo sobre este péptido [6]. En resumen, las especies A y B son diferentes en cuanto a la interacción con la columna de fase reversa, pero idénticos en masa; en consecuencia, puede suponerse que son isoformas diferentes del péptido GS-Ts16.

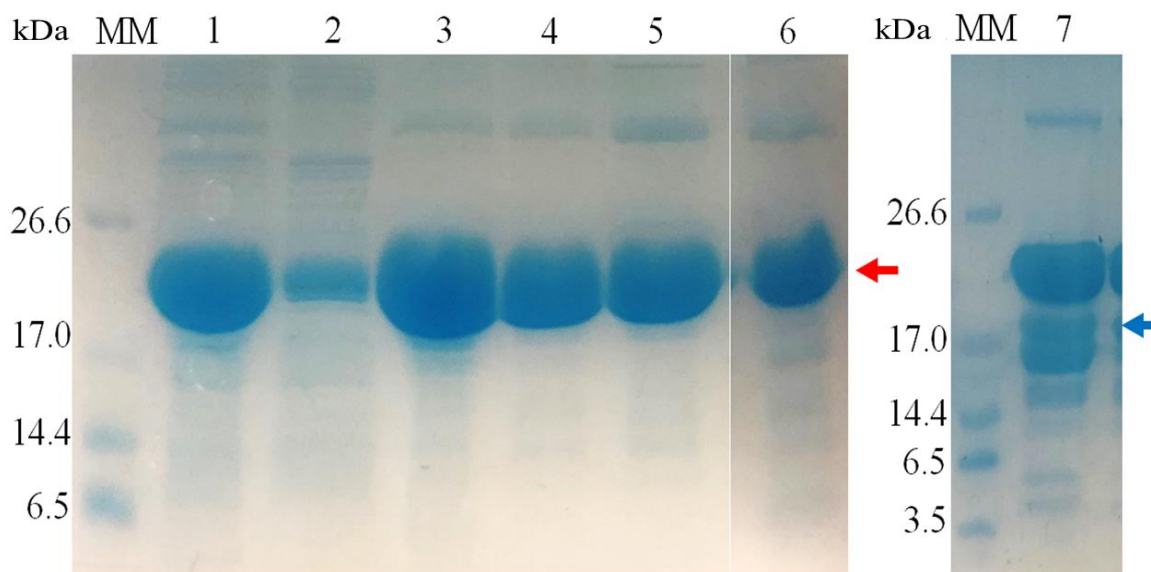


Figura 14. Expresión y purificación de GS-Ts16. **A)** Purificación de rDsbC, la flecha roja indica la banda correspondiente a la proteína de fusión Trx-Ts16 (20 KDa) 1) fracción soluble del lisado celular, 2) fracción no retenida en la columna HisTrap (GE), 3) lavado con 25 mM imidazol, 4) lavado con 50 mM imidazol, 5) elución con 500 mM imidazol, 6) fracción eluida con 500 mM imidazol dializada. Marcador Polypeptide BioRad. **B)** Digestión enzimática con trombina, la flecha azul indica la banda correspondiente al residuo de corte (17 KDa) 7) muestra después de 4 h de digestión a temperatura ambiente, Marcador Polypeptide BioRad.

Efecto de la oxidoreductasa DsbC en el plegamiento de la toxina Ts16

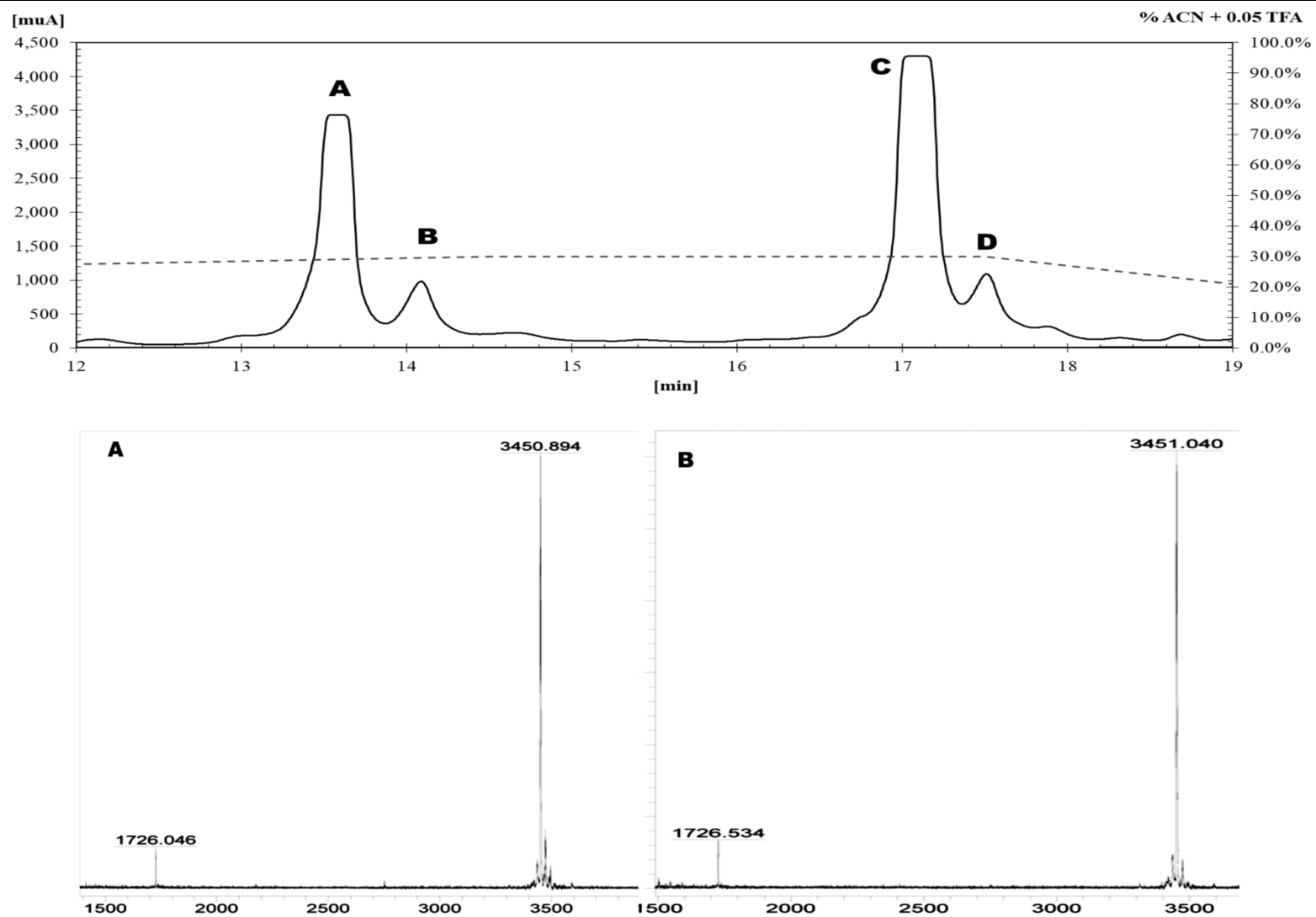


Figura 15. Purificación por CLAE-FR de GS-Ts16. Arriba se muestra el cromatograma de la GS-Ts16 después de la digestión enzimática, segunda cromatografía de afinidad metal-quelato y extracción en fase sólida; columna Júpiter Proteo C12 y detección a 230 nm. Abajo se muestran los espectros de masas MALDI-TOF de las fracciones colectadas del cromatograma, cuyos tiempos de retención son: **A)** 13.5 min y **B)** 14 min. En todos los espectros de masa se usó ácido α -ciano-4-hidroxicinámico como matriz en una relación 1:1 (proteína : matriz).

Para confirmar que las especies A (13.5 min) y B (14 min) son péptidos plegados, se procedió a adquirir los experimentos de protón de Resonancia Magnética Nuclear y compararlos con el espectro previamente adquirido del mismo péptido [6]. El espectro de la muestra A (13.5 min) es idéntico al espectro patrón (Figura 16, A y B); conservando las señales características de la GS-Ts16 a 10.1 ppm del protón de amida de la cisteína 26, a 0.6 ppm de los protones alifáticos en el carbono delta de la isoleucina 29 y a 0.7 ppm de los protones alifáticos del carbono gamma del mismo residuo. Por otro lado, el espectro de la especie B (14 min) también presenta estas señales características de la GS-Ts16; sin embargo, la dispersión de las señales en la región de amida y de alifáticos es escasa, las señales no están bien definidas (Figura 16, A y C). Así, la especie A (13.5 min) es la isoforma nativa de GS-Ts16, en función de los experimentos previos [6]. En lo sucesivo, será denominada la isoforma nativa. Mientras que la especie B (14 min) muestra un grado de desnaturalización observado en el espectro de ^1H RMN; por tanto, se considerará como la isoforma de GS-Ts16 no nativa. Los rendimientos finales fueron 0.62 mg L^{-1} de cultivo y 0.16 mg L^{-1} de cultivo para la especie nativa y la no nativa de GS-Ts16, respectivamente.

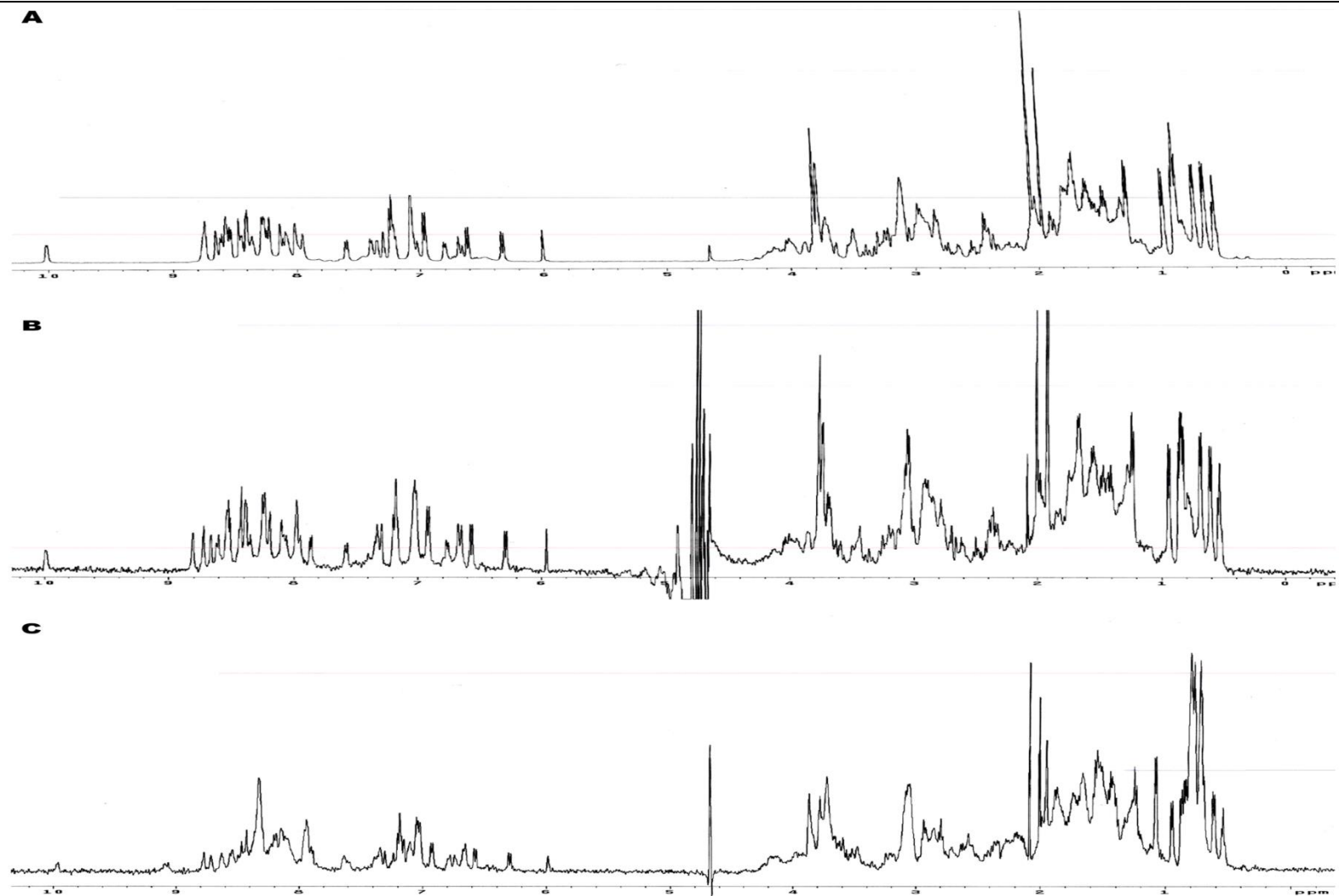


Figura 16. Caracterización de GS-Ts16. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón de GS-Ts16. **A)** espectro de referencia tomado de Saucedo et al. (2012) [6], **B)** espectro de la muestra con tiempo de retención 13.5 min (denominada como A en figura 15), **C)** espectro de la muestra con tiempo de retención 14 min (denominada como B en figura 15). Todas las muestras se resuspendieron en H₂O grado MilliQ con 5% D₂O. Todos los espectros se obtuvieron a 25°C y con supresión de agua.

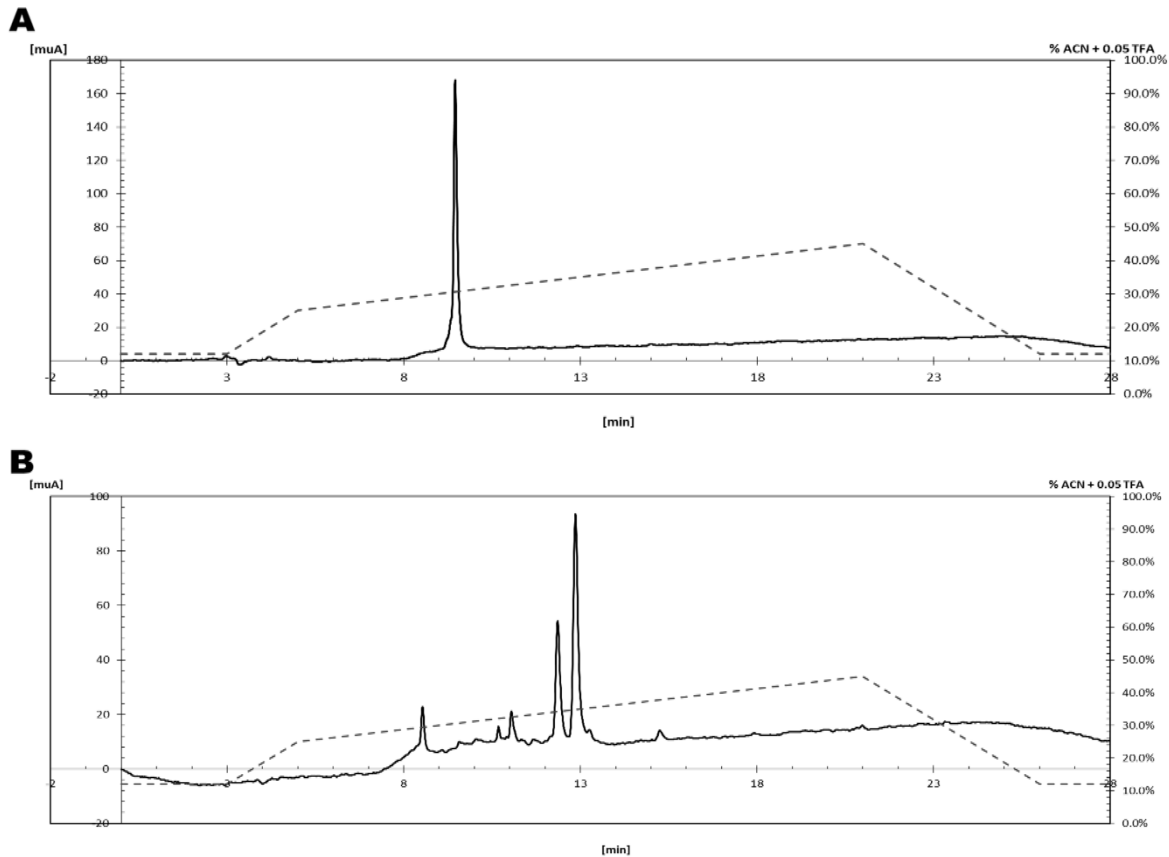


Figura 17. Cromatogramas de las isoformas GS-Ts16 nativa (A) y no nativa (B) después de los experimentos de $^1\text{H-RMN}$ y MALDI-TOF.

Finalmente, se comprobó la pureza de las isoformas nativa y no nativa de GS-Ts16 por CLAE-FR usando el programa de elución propuesto para el análisis de las diferentes especies que se puedan generar durante el proceso de replegamiento (programa distinto al de purificación en cuanto a la pendiente de elución). Los cromatogramas mostrados en la figura 17 indican que la muestra denominada como nativa es pura con una señal única a 9.5 min (Figura 17 A). Por otro lado, la muestra nombrada como no nativa es una mezcla aun de varias especies, al menos hay dos especies que son mayoritarias (Figura 17 B).

La enzima rDsbC contribuye en el replegamiento de lisozima

Para demostrar que la enzima purificada contribuye con el replegamiento de proteínas estabilizadas por enlaces disulfuro[39], [42], se usó la lisozima purificada de la clara de huevo de gallina (*Merck*) como sustrato y la actividad lítica de la lisozima se midió por la lisis de *Micrococcus luteus* por espectrofotometría.

La lisozima se sometió a un tratamiento previo para generar enlaces disulfuro distintos a los nativos; en resumen, se desnaturalizó y redujo en una disolución 5 M urea y 100 mM DTT; después se trató con 2 mM H_2O_2 y 0.05 mM CuCl_2 para volver a oxidar las cisteínas y

producir lisozima oxidada no nativa. A parte, rDsbC se redujo en 10 mM DTT. La renaturalización procedió mezclando en una relación molar de 1:1 rDsbC reducido con lisozima oxidada no nativa en 20 mM fosfatos pH 7.5, permitiendo la reacción por 2 h a 37°C. Adicionalmente, se usó un experimento de control con la enzima PDI (Sigma Aldrich) para comparar con el efecto observado de la enzima rDsbC empleada.

Se midió la actividad lítica de las muestras de lisozima (Figura 18). Para tener una referencia de la actividad enzimática de la lisozima, se midió la actividad correspondiente a la enzima resuspendida directamente del liofilizado comercial, muestra denominada como “Nativa”. La lisozima oxidada no nativa, obtenida del tratamiento desnaturalizante, reductor y posterior oxidación, aun muestra actividad con un 75.14% de la actividad de la lisozima nativa. Mientras que la actividad de las muestras renaturalizadas es mayor que la del control nativo. La lisozima renaturalizada sin adición de rDsbC mostró 206.3 % de actividad, la lisozima renaturalizada con adición de rDsbC mostró 257.3% de actividad y la muestra de lisozima renaturalizada con adición de PDI mostró 253.2% de actividad. Las tres últimas con respecto a la lisozima nativa control.

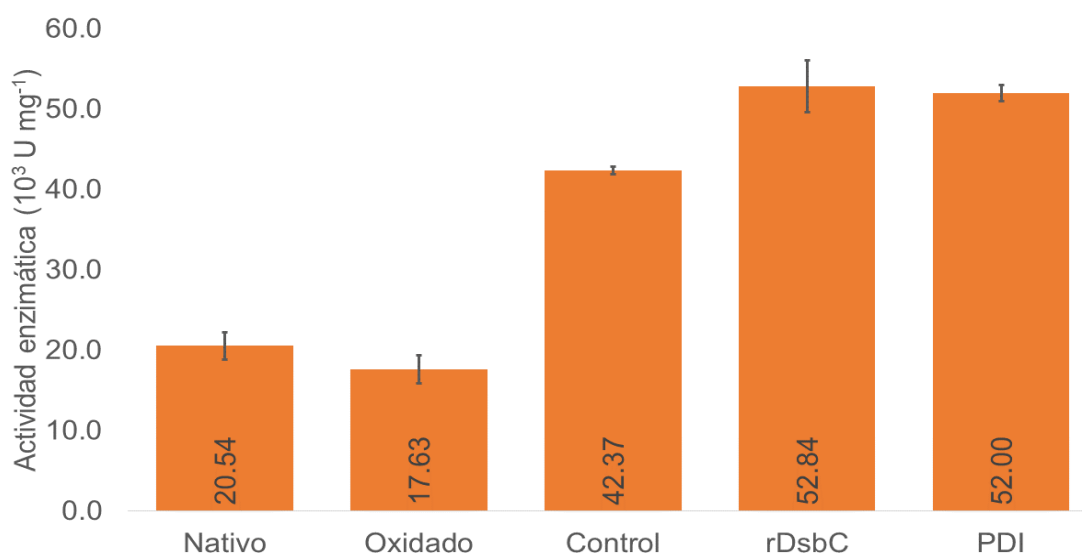


Figura 18. Renaturalización de lisozima en presencia de PDI. Actividad lítica de lisozima sobre *Micrococcus luteus* indicada en unidades de actividad específica [U mg⁻¹]. Las muestras “Nativo” es la actividad correspondiente a la enzima resuspendida directamente del liofilizado comercial, “oxidado” es la actividad asociada a la enzima que fue tratada por desnaturalización, reducción y subsecuente oxidación rápida con H₂O₂ y CuCl₂, “control” es la actividad debida a la enzima previamente tratado por desnaturalización, reducción, subsecuente oxidación rápida con H₂O₂ y CuCl₂ y tratada en el medio de replegamiento sin rDsbC adicionada, “PDI” es la actividad de la enzima previamente trata por desnaturalización, reducción, subsecuente oxidación rápida con H₂O₂ y CuCl₂ y tratada en el medio de replegamiento con 0.5 μM de enzima PDI adicionada en el medio en relación y “rDsbC” es la actividad de la enzima previamente trata por desnaturalización, reducción, subsecuente oxidación rápida con H₂O₂ y CuCl₂ y tratada en el medio de replegamiento con 0.5 μM de enzima rDsbC adicionada en el medio.

Tabla 2. Prueba *t de student* para dos muestras independientes con igual tamaño de muestra y varianzas iguales.

Repetición	Muestras		
	"Nativa"	"Control"	"rDsbC"
1	19.3222	42.7183	50.5357
2	21.7621	42.0283	55.1431
Promedio	20.5421	42.3733	52.8394
Desviación estándar	1.2200	0.3450	2.3037
	"Nativa" / "Control"		"Control" / "rDsbC"
n	2		2
Grados de libertad	2		2
S X1X2	0.8965		1.6471
t calculado	24.3524		6.3541
t tabla	4.3027		4.3027

El análisis estadístico de "t de student" para dos muestras independientes con igual tamaño de muestra y varianza iguales [61] indica que el experimento "Control" es significativamente diferente con respecto al experimento "Nativo". También hay diferencia significativa con el experimento "rDsbC" (Tabla 2). La muestra "Nativa" comparada con la muestra "Control" presenta un valor de "t" calculado igual a 24.3524, mayor al valor de la tabla "t-Student" (4.3027); por tanto, se acepta que existe diferencia significativa entre ambas muestras. De igual manera, el calculo entre las muestras "Control" y la muestra "rDsbC" (6.3541) muestra que es mayor al valor "t" de tabla (4.3027). En conclusión, la diferencia si es significativa entre los experimentos control y con enzima rDsbC adicionada. El ensayo con PDI se hizo solo una vez; por tanto, no se puede hacer el mismo análisis estadístico con esta muestra.

Para explicar la diferencia entre la muestra "Control" y la muestra "Nativa", la literatura postula que una disolución de 69 μM de lisozima provoca un cambio de 0.115 unidades de absorbancia a 450 nm por minuto en una suspensión celular de *Micrococcus luteus*[52] y la información provista por el fabricante indica que la lisozima en liofilizado conserva su actividad hasta por 4 años manteniendo en congelación a -20°C [60]. Por tanto, la lisozima usada como control nativo solo conserva el 26.1 % de su actividad total; explicándose el aumento de la actividad después de los experimentos renaturalizantes con respecto a la lisozima nativa control.

Con respecto al uso de las enzimas rDsbC y PDI, se observa que la capacidad renaturalizante de ambas es semejante; demostrando que rDsbC contribuye a la renaturalización de la lisozima oxidada no nativa de la misma forma que lo hace la enzima PDI comercial. Es importante recalcar que el análisis estadístico confirma esta afirmación al demostrar que hay diferencia estadística entre los experimentos "Control" y con enzima rDsbC adicionada.

Renaturalizar GS-Ts16 con rDsbC produce especies distintas a las esperadas

Al igual que con la lisozima, se preparó la GS-Ts16 para usarla como sustrato de la rDsbC. La isoforma de GS-Ts16 nativa se desnaturalizó y redujo en 5 M urea y 100 mM DTT, para después oxidarse en 2 mM H₂O₂ y 0.5 mM CuCl₂, para volver a oxidar las cisteínas y producir GS-Ts16 oxidada no nativa. Como evidencia de que durante el proceso no se hidrolizó la toxina se muestran los espectros de Masas MALDI-TOF de la toxina antes y después del proceso de oxidación (Figura 19). Después de la desnaturalización, la toxina conserva su masa original (3448 Da) y posterior al proceso de oxidación rápida, la toxina aún conserva su masa (3446 Da); adicionalmente, se observa la presencia de una señal alrededor de 7,000 Da, que puede deberse a la formación del dímero.

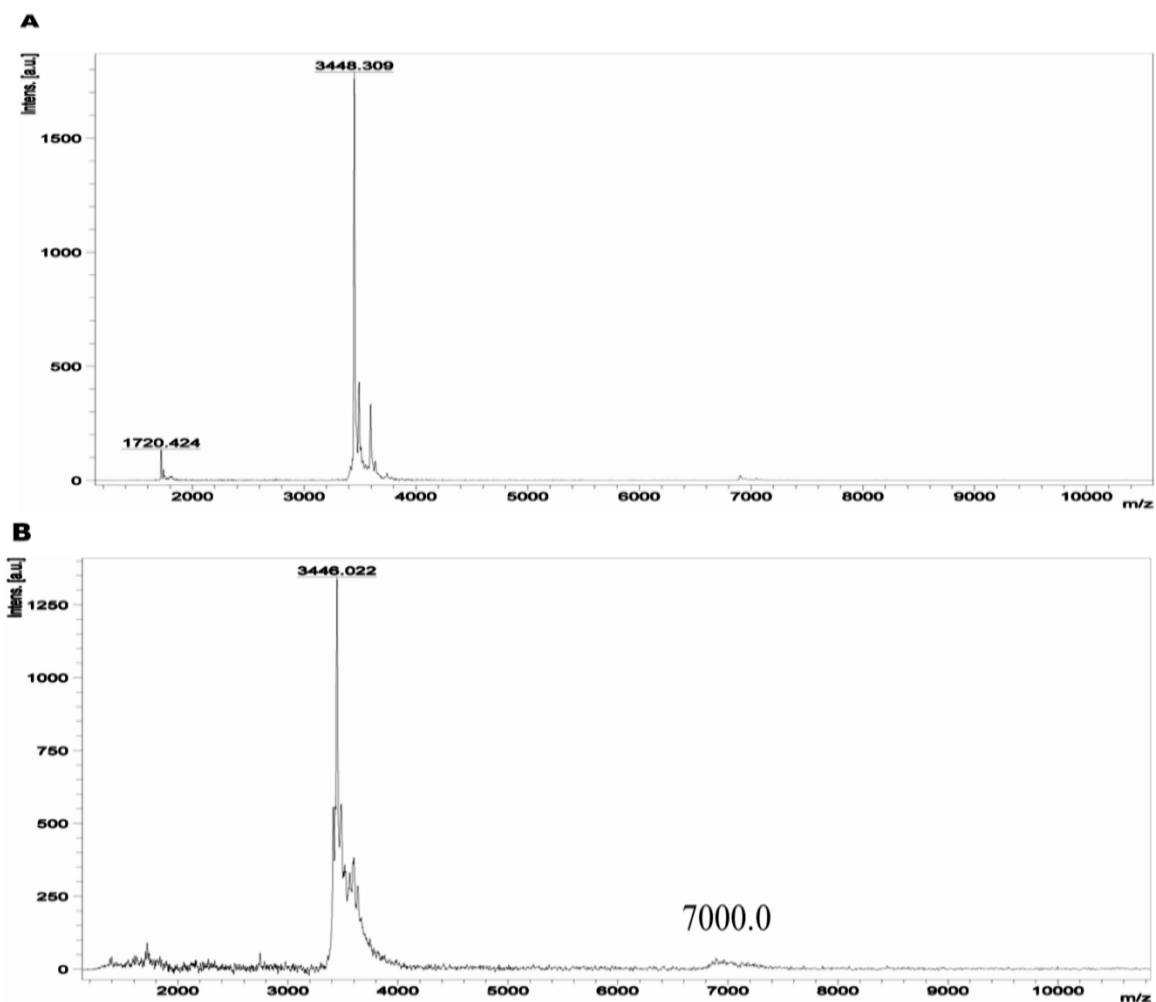


Figura 19. Preparación de GS-Ts16. A) Espectro de masas MALDI-TOF de GS-Ts16 desnaturalizada y reducida. B) Espectro de masas MALDI-TOF de GS-Ts16 desnaturalizada y oxidada no nativa. Se observa que el proceso preparativo (desnaturalización, reducción y posterior oxidación rápida) de la isoforma de GS-Ts16 Nativa no hidroliza o modifica la masa del péptido.

La renaturalización se realizó mezclando en una relación molar 1:1 GS-Ts16 oxidada no nativa y rDsbC reducido en 50 mM fosfatos pH 7.5, permitiendo la reacción por 2 h a 37°C. Las especies generadas se detectaron por CLAE-FR (Figura 20). Tanto la reacción control sin adición de rDsbC (cromatograma azul) como la reacción con rDsbC adicionado (cromatograma verde) muestran un cromatograma semejante; ambos cromatogramas son parecidos al de la muestra oxidada no nativa (cromatograma rojo). Bajo las dos condiciones de reacción se favorecen especies con tiempo de retención entre 9.5 y 10.5 min. Sin embargo, ninguna especie muestra el tiempo de retención de la GS-Ts16 nativa (cromatograma en negro). Bajo las condiciones de reacción propuestas, la rDsbC no favorece la renaturalización de GS-Ts16 distribuyéndose entre varias isoformas no nativas; estas isoformas son semejantes a las iniciales del proceso de renaturalización, implicando que se formaron en el proceso preparativo de oxidación no nativa.

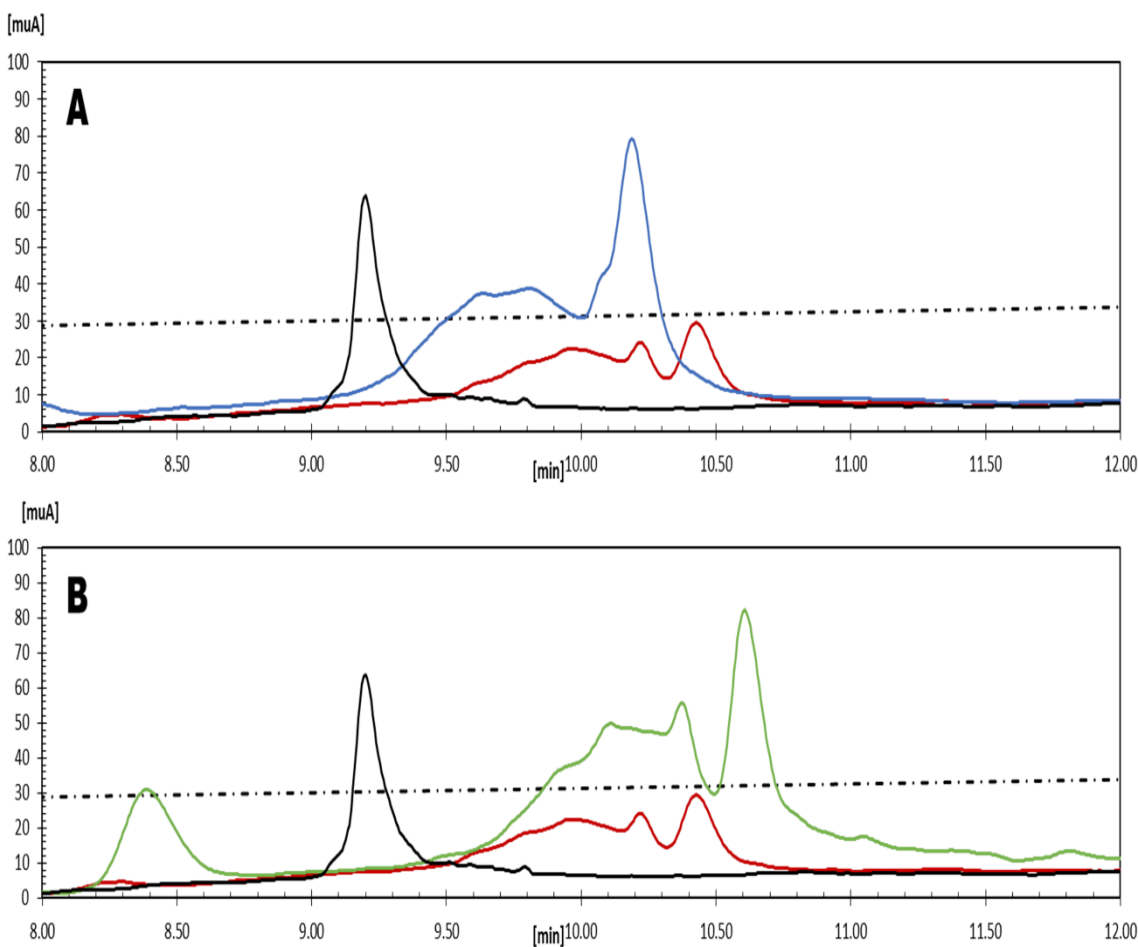


Figura 20. Renaturalización de GS-Ts16 con rDsbC. A) Reacción control sin adición de rDsbC (azul), B) Reacción con adición de rDsbC en una relación molar 1:1 (verde). En todos los casos se muestra la especie nativa (negro) y la muestra inicial de GS-Ts16 oxidada no nativa (rojo). Los cromatogramas de las reacciones de renaturalización (azul y verde) son semejantes entre sí y con el sustrato inicial de la reacción (rojo). En ningún caso se genera la especie con tiempo de retención de 9.5 min (negro), correspondiente con la isoforma de GS-Ts16 nativa.

Si los cromatogramas de las reacciones sobre GS-Ts16 son semejantes antes y después de la renaturalización (cromatogramas azul, verde y rojo, figura 20); estas debieron generarse durante el proceso de oxidación no nativa. Para comprobar esta hipótesis, se utilizó la isoforma purificada no nativa de GS-Ts16 como sustrato (Figura 15 B). Esta isoforma no requiere un proceso previo de preparación para su uso como sustrato puesto que ya es una isoforma distinta a la nativa. Se emplearon las mismas condiciones de renaturalización y la detección también se hizo por CLAE-FR. En la reacción sin rDsbC adicionado hay un comportamiento semejante a la reacción sobre GS-Ts16 oxidada no nativa (cromatogramas azul, figuras 20 A y 21 A), aunque hay una señal que coincide con el tiempo de retención de la especie nativa (cromatograma negro, figura 21 A). Mientras que la reacción con rDsbC adicionada (cromatograma verde, figura 21 B) produce un abanico de especies y no hay ninguna señal semejante a la señal de la especie nativa (cromatograma negro, figura 21 B). Aunque en ambos casos ya no hay especies semejantes a las originales (cromatograma rojo, figura 21); el medio de renaturalización contribuye a cambiar la conformación del péptido hacia el mismo estado que en el experimento usando GS-Ts16 oxidada no nativa (cromatogramas azul y verde, figura 20).

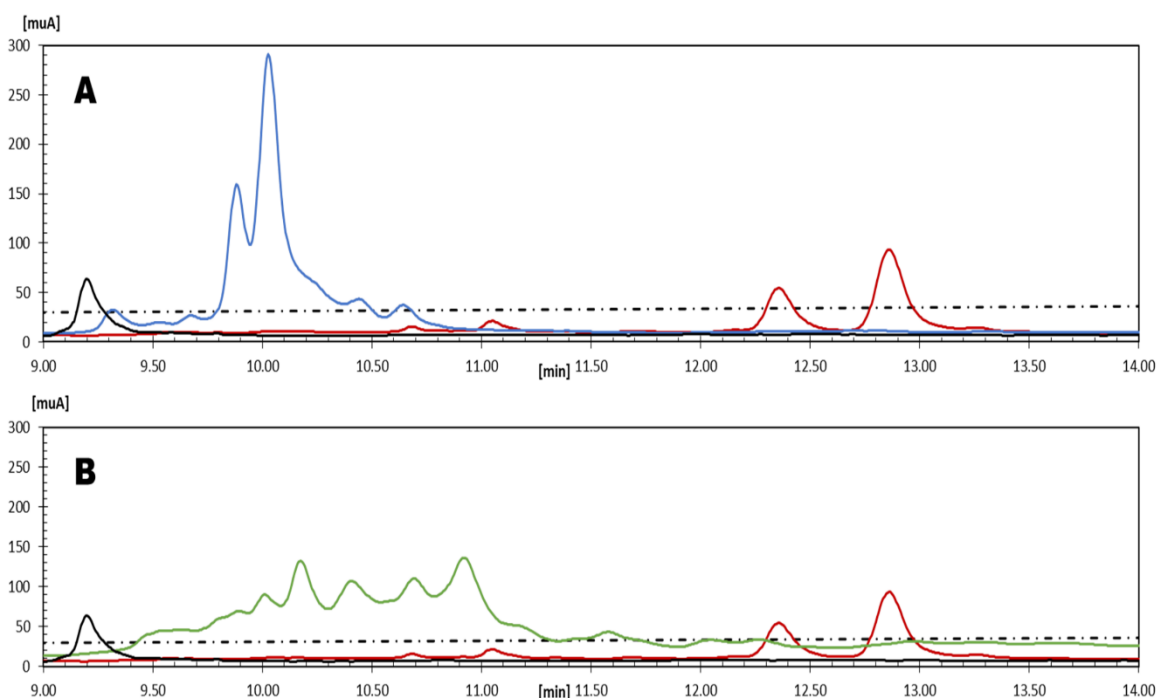


Figura 21. Renaturalización de GS-Ts16 no nativa con rDsbC. **A.** Cromatograma del experimento control sin adición de rDsbC al medio de reacción (azul). **B.** Cromatograma del experimento con adición de rDsbC en una relación molar 1:1 al medio de reacción (verde). En todos los casos se muestra la especie nativa (negro) y la muestra de GS-Ts16 no nativa (rojo). El cromatograma de la reacción de renaturalización sin rDsbC adicionado (azul) es semejante con el experimento anterior (azul, figura 20). El experimento con rDsbC adicionado (verde) es diferente y muestra un abanico de isoformas generadas. En ningún caso se genera la especie con tiempo de retención de 9.5 min (negro), correspondiente con la isoforma de GS-Ts16 nativa; no obstante, ya no hay isoforma original (rojo).

Aunque el medio contribuye en la reconformación del péptido, aún queda sin resolver porque el proceso de renaturalización es ineficiente para regresar el péptido al estado nativo. Así, se comprobó que la isoforma denominada nativa sea la isoforma favorecida por el proceso renaturalizante. Entonces, la isoforma GS-Ts16 denominada como nativa se sometió a las condiciones de renaturalización con y sin adición de enzima rDsbC. Se permitió la interacción por 2 h a 37°C y la mezcla de reacción final se analizó por CLAE-FR y espectrometría de Masas MALDI-TOF (Figura 22).

Como se había intuido, en las condiciones de trabajo existen otras isoformas estables que no permiten llegar a la nativa o más estable. El espectro de Masas MALDI-TOF de la muestra tratada sin adición de rDsbC indica que no hay componentes de peso molecular considerable adicionados en el medio de reacción o que ocurra degradación de la toxina por el tratamiento (Figura 22B); por tanto, las señales en el cromatograma se deben a las diferentes especies generadas en la renaturalización de GS-Ts16 (Figura 22A). En cambio, cuando se involucra rDsbC en la reacción, el espectro de Masas MALDI-TOF muestra que hay componentes de peso molecular considerable en el medio de reacción, pero que no hay degradación de la toxina (Figura 22D); inferido por la señal propia de la toxina (3449 Da). No obstante, el cromatograma indica la formación de varias especies después del tratamiento (Figura 22C).

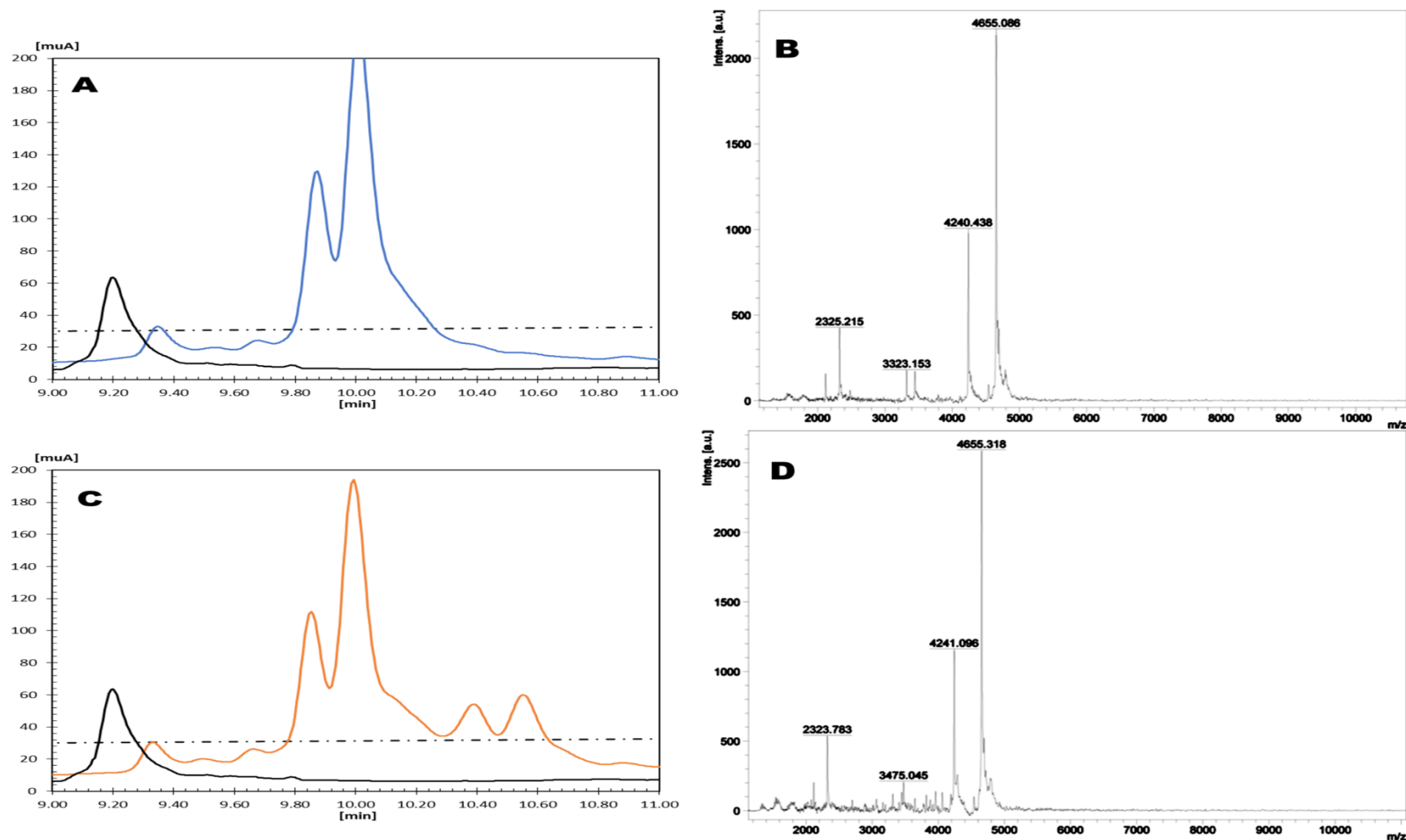


Figura 22. Estabilidad de GS-Ts16 nativa frente a rDsbC. 1. Estabilidad de GS-Ts16 en medio de renaturalización sin rDsbC adicionada; cromatograma (A) y espectro de masas MALDI-TOF (B). 2. Estabilidad de GS-Ts16 en medio de renaturalización con rDsbC adicionada en una relación molar 1:1; cromatograma (C) y espectro de masas MALDI-TOF (D). En todos los cromatogramas se muestra la especie nativa (negro).

Discusión

rDsbC actúa como reductasa durante la renaturalización de lisozima

El aumento en la actividad lítica de la lisozima renaturalizada con respecto a la actividad basal del experimento “Control” en la figura 18 es evidencia sólida de que rDsbC sí funciona. Además, y en palabras de Winter (2013) “*afirmaciones extraordinarias requieren evidencia extraordinaria*”[61], el análisis estadístico respalda esta afirmación. Lo que no queda claro es cuál de los tres mecanismos de acción enzimática de rDsbC está operando: isomerasa, reductasa o chaperona.

La DsbC funge como isomerasa si y solo si se forma la cavidad hidrofóbica del homodímero [36], [48]. En el presente trabajo no se obtuvo evidencia experimental que muestre o desapruebe que la DsbC usada forme el homodímero. Adicionalmente, los experimentos previos no han comprobado su dimerización para atribuir la actividad isomerasa de la DsbC usada en sus resultados [37], [50]. Por tanto, no puede atribuirse el aumento de la actividad lítica sobre *Micrococcus luteus* de la lisozima renaturalizada a la actividad isomerasa de DsbC (Figura 18).

Por otro lado, la literatura indica que la DsbC puede actuar como reductasa en forma monomérica [36], [37], [46], [47]. Considerando que el sustrato lisozima está oxidado sin formar los enlaces disulfuro nativos y la enzima rDsbC está reducida y es más probable que esté en su forma monomérica; se infiere que la renaturalización ocurre en un mecanismo de dos pasos. El primer paso es la reducción de los enlaces disulfuro por la DsbC, generando una lisozima reducida que puede explorar el embudo de plegamiento para alcanzar su estado nativo. El segundo paso involucra la oxidación de la lisozima por algún agente oxidante en el medio, como puede ser el oxígeno disuelto.

Además, conociendo que la DsbC funge como chaperona por su dominio de unión a péptidos en el dominio N-terminal de dimerización [36], [48]; es posible que la lisozima reducida y desplegada se haya unido, reduciendo la posibilidad de agregación entre los pasos uno y dos (Figura 23).

No obstante, aún queda pendiente explicar el aumento de la actividad lítica en el ensayo espontáneo sin adición de DsbC (Figura 18). Se ha demostrado que el mecanismo de replegamiento de la lisozima con sus enlaces disulfuro reducidos ocurre en un proceso en tres etapas que se completa en cerca de 200 ms y en el cual los enlaces disulfuro no son relevantes para que la lisozima se pliegue correctamente, en cambio, los disulfuros contribuyen en la estabilidad de la conformación nativa final y en los intermediarios plegados [63]. Así, la actividad observada en la lisozima renaturalizada espontáneamente debe ser producto de la estabilidad propia de la proteína y los intermediarios con enlaces disulfuro distintos a los nativos permanecen inactivos por la ausencia de rDsbC.

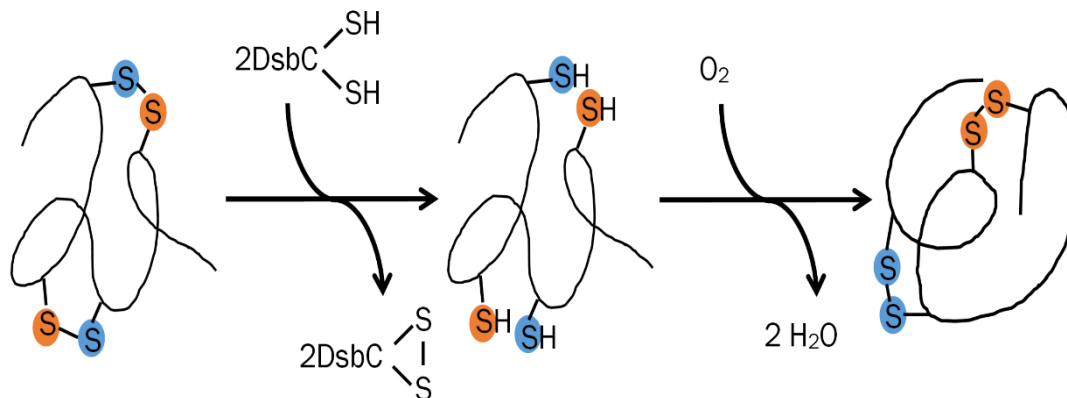


Figura 23. Mecanismo propuesto de acción de rDsbC sobre la renaturalización de lisozima. Lectura de izquierda a derecha. En un primer paso, la enzima rDsbC reduce los enlaces disulfuros disponibles de la lisozima oxidada no nativa, generándose la isoforma reducida. Esta isoforma reducida de la lisozima podrá explorar el paisaje de plegamiento hasta alcanzar el estado nativo. Después, en un segundo paso, el oxígeno del medio o algún otro oxidante, oxidará la lisozima para formar nuevos enlaces disulfuro. Diagrama de elaboración propia con fines ilustrativos, no debe considerarse como el mecanismo real.

En todos los casos, el aumento de actividad sobre el control nativo (resuspensión de lisozima directa del liofilizado comercial) es resultado de la desnaturalización propia de la lisozima por su tiempo en refrigeración, como lo estipula el fabricante [60]. Un estudio sobre la reducción en la estructura secundaria de la lisozima en función del tiempo ha demostrado que la pérdida del porcentaje de hebras beta está ligado con la reducción en la actividad enzimática; particularmente por el cambio de ambiente de los residuos de ácido aspártico 52 y ácido glutámico 35, que son importantes en la actividad lítica [54].

Al usar PDI se comprobó el resultado observado por la acción de DsbC en la renaturalización de la lisozima (Figura 18). Se ha demostrado que PDI actúa en la formación, reducción e isomerización de enlaces disulfuro [64]; aquí, se puede inferir que la DsbC está actuando como reductasa, de la misma forma que la PDI

La renaturalización favorece una especie de GS-Ts16 que es distinta a la nativa

En concordancia con los experimentos sobre lisozima y conociendo la función de la rDsbC purificada, la isoforma GS-Ts16 nativa se sometió al mismo proceso de desnaturalización oxidativa para generar una colección de isoformas oxidadas no nativas. Entonces, rDsbC cumpliría su función de reductasa sobre los enlaces disulfuro no nativos y como chaperona impidiendo la agregación de estas especies reducidas; resultando en la recuperación de la isoforma nativa original. Sin embargo, este no fue el comportamiento observado. El proceso de oxidación no nativo produjo isoformas que ya son estables y la renaturalización no las cambió, indistintamente si había o no enzima presente; adicionalmente, el resultado

fue el mismo cuando se cambió el sustrato por la isoforma de GS-Ts16 purificada y demostrada como no nativa.

Durante el proceso de oxidación no nativa de la isoforma GS-Ts16 desnaturalizada se debió formar una colección de isoformas oxidadas, probablemente se formaron estados intermediarios estables durante el proceso de diálisis previo a la renaturalización (20 mM fosfatos pH 7.5 por 16 h a temperatura ambiente). En consecuencia, rDsbC no fue capaz de reducir los enlaces disulfuro de estos estados intermediarios estables durante el ensayo de renaturalización, probablemente por no ser accesibles al sitio activo de la enzima; explicándose así, el resultado semejante entre las reacciones control y con enzima (Figura 20). Hay evidencia que respalda este comportamiento. En un estudio previo, se mostró que el replegamiento oxidativo de la RNasa A comprende dos etapas. Primero se oxida toda la proteína para poblar todas las especies posibles, de las cuales se forman dos intermediarios estables con tres enlaces disulfuros nativos. Durante la segunda etapa, estos intermediarios convergen en la conformación nativa de la enzima [65]. Por tanto, el tiempo entre la oxidación no nativa y el ensayo de renaturalización debió promover un reordenamiento de las especies generadas conduciendo hacia las más estables en las condiciones de conservación. Estos estados intermediarios no fueron modificados por las condiciones de renaturalización ni por la presencia de rDsbC.

Por otro lado, cambiar el sustrato por una isoforma no nativa de GS-Ts16 produjo un resultado semejante al experimento anterior; aun cuando fueron eliminados del proceso las etapas de desnaturalización y oxidación no nativa. La composición del medio de renaturalización provoca una reconfiguración de la toxina para producir isoformas intermediarias estables en el curso de dos horas. Por consiguiente, el medio de renaturalización es participe activo en el cambio de configuración de la toxina. En cambio, adicionar rDsbC produce más isoformas, incluidas las dos estables por el proceso sin enzima; indicando que la enzima participa, junto con el medio de renaturalización, en la formación de varias isoformas estables de GS-Ts16.

Además, y sorpresivamente, la isoforma de GS-Ts16 denominada como nativa mostró ser susceptible a cambio conformacional en las condiciones de renaturalización, indistintamente si la enzima rDsbC está presente o no. Bajo estas condiciones, se favorecen las mismas isoformas observadas que en los experimentos anteriores. Esto es significativo, porque las condiciones probadas no conducirían a la isoforma esperada. Las condiciones de renaturalización usadas son adecuadas para el funcionamiento óptimo de la enzima rDsbC, de acuerdo con la literatura [8], [42]; sin embargo, mostraron no ser las adecuadas para favorecer la isoforma nativa de GS-Ts16.

En la renaturalización de la lisozima asistido por rDsbC bajo condiciones semejantes que con la GS-Ts16, la enzima actúa como chaperona y contribuye a recuperar la actividad lítica de la lisozima oxidada no nativa.

Conclusiones

Aunque la literatura indica que el replegamiento oxidativo de la lisozima es independiente de la formación de los enlaces disulfuro, puede atribuirse una actividad de reductasa que provoca el aumento en la actividad lítica de las muestras tratadas con rDsbC.

El tiempo de diálisis entre la oxidación no nativa y el ensayo de renaturalización de GS-Ts16 promovió un reordenamiento de las isoformas generadas conduciendo hacia las más estables en las condiciones de conservación; mismas que no fueron modificadas por las condiciones de renaturalización ni por la presencia de rDsbC.

Eliminar los pasos de desnaturalización y oxidación no nativa conducen al mismo grupo de especies estables después de la renaturalización; indicando que el medio de renaturalización contribuye significativamente en la formación de estas especies más estables en comparación con el estado nativo de GS-Ts16.

Las condiciones generales de renaturalización deben favorecer la formación de estructura nativa en el sustrato y no limitarse a la actividad óptima de la enzima DsbC. Las condiciones usadas mostraron favorecer una isoforma distinta a la nativa en la toxina GS-Ts16.

Hablando de toxinas estabilizadas por enlaces disulfuro, es de particular interés definir un mecanismo experimental que favorezca la formación de la isoforma nativa con la conectividad de enlaces disulfuro correcta. La enzima DsbC, con actividad isomerasa de enlaces disulfuro y previamente usada para aumentar el rendimiento de expresión de proteínas estabilizadas por enlaces disulfuro, demostró ser ineficiente para aumentar el rendimiento de biosíntesis de la toxina GS-Ts16 con la conectividad de enlaces disulfuro esperada.

Perspectivas

Demostrar que la enzima purificada muestra actividad reductasa usando un sustrato más adecuado en lugar de la lisozima; por ejemplo, la RNasa A, que tiene un replegamiento oxidativo dependiente de la formación de los enlaces disulfuro.

Aunque en los trabajos previos que usan DsbC para replegar proteínas no purifican la enzima por encima del 95 % de pureza, es posible que si se aumenta la pureza de esta se mejoren los resultados observados.

Probar condiciones de renaturalización que favorezcan el estado nativo de la GS-Ts16.

Utilizar este método en un péptido cuya expresión heteróloga en *Escherichia coli* sea dirigida hacia agregados insolubles y por tanto requiera de un proceso de replegamiento *in vitro*.

Referencias

- [1] K. Maskos, M. Huber-Wunderlich, and R. Glockshuber, "DsbA and DsbC-catalyzed oxidative folding of proteins with complex disulfide bridge patterns in vitro and in vivo," *J. Mol. Biol.*, vol. 325, no. 3, pp. 495–513, 2003.
- [2] D. Missiakas, C. Georgopoulos, and S. Raina, "The Escherichia coli dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation.," *EMBO J.*, vol. 13, no. 8, pp. 2013–2020, 1994.
- [3] Y. Akiyama, S. Kamitani, N. Kusukawa, and K. Ito, "In vitro catalysis of oxidative folding of disulfide-bonded proteins by the Escherichia coli dsbA (ppfA) gene product," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 31, pp. 22440–22445, 1992.
- [4] J. Yang, G. Kanter, A. Voloshin, R. Levy, and J. R. Swartz, "Expression of active murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in an Escherichia coli cell-free system," *Biotechnol. Prog.*, vol. 20, no. 6, pp. 1689–1696, 2004.
- [5] E. D. I. Luccio *et al.*, "Parameters affecting in vitro oxidation/folding of maurotoxin, a four disulphide-bridged scorpion toxin," *Biochem. J.*, vol. 358, pp. 681–692, 2001.
- [6] A. L. Saucedo *et al.*, "New tricks of an old pattern: Structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 15, pp. 12321–12330, 2012.
- [7] D. Flores-Solis, "Biosíntesis, purificación, caracterización y determinación estructural por RMN de la toxina de alacrán Ts16," Universidad Nacional Autónoma de México, 2012.
- [8] L. Jiao, J. Kim, W. Song, B. Yoon, K. Lee, and N. Ha, "Crystal structure of the periplasmic disulfide-bond isomerase DsbC from Salmonella enterica serovar Typhimurium and the mechanistic implications," *J. Struct. Biol.*, vol. 183, no. 1, pp. 1–10, 2013.
- [9] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, "Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges," *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. 172, pp. 1–17, 2014.
- [10] H. M. Berman *et al.*, "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, pp. 235–242, 2000.
- [11] M. Berkmen, "Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia coli," *Protein Expr. Purif.*, vol. 82, no. 1, pp. 240–251, 2012.
- [12] F. Hatahet, D. Boyd, and J. Beckwith, "Disulfide bond formation in prokaryotes: History, diversity and design," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1844, no. 8, pp. 1402–1414, 2014.
- [13] H. Kadokura, F. Katzen, and J. Beckwith, "Protein Disulfide Bond Formation in Prokaryotes," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 72, pp. 111–135, 2003.
- [14] S. Raina and D. Missiakas, "Making and Breaking disulfide Bonds," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 51, pp. 179–202, 1997.
- [15] C. Landeta, D. Boyd, and J. Beckwith, "Disulfide bond formation in prokaryotes," *Nat. Microbiol.*, vol. 3, no. 3, pp. 270–280, 2018.
- [16] O. Kolaj, S. Spada, S. Robin, and J. G. Gerard, "Use of folding modulators to improve heterologous protein production in Escherichia coli," *Microb. Cell Fact.*, vol. 8, pp. 1–17, 2009.

- [17] J. Messens and J.-F. Collet, "Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 38, pp. 1050–1062, 2006.
- [18] S. A. Izmailov, I. S. Podkorytov, and N. R. Skrynnikov, "Simple MD-based model for oxidative folding of peptides and proteins," *Sci. Rep.*, vol. 9293, no. 7, pp. 1–16, 2017.
- [19] J. C. Wilks and J. L. Slonczewski, "pH of the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli*: Rapid Measurement by Green Fluorescent Protein Fluorimetry □," *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 15, pp. 5601–5607, 2007.
- [20] M. F. Sardi-Piano, "Caracterización de la acidez y nucleofilia de tioles de bajo peso molecular y tioles proteicos," Universidad de la Republica, 2011.
- [21] F. C. Neidhardt *et al.*, Eds., *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, volume 1*, Second. Washington, D. C.: ASM Press, 1996.
- [22] A. K. Wallis and R. B. Freedman, "Assisting Oxidative Protein Folding: How Do Protein Disulphide-Isomerases Couple Conformational and Chemical Processes in Protein Folding?," in *Molecular Chaperones*, S. Jackson, Ed. Springer, 2013, pp. 1–34.
- [23] N. Lambert and R. B. Freedman, "Structural properties of homogeneous protein disulphide-isomerase from bovine liver purified by a rapid high-yielding procedure," *Biochem. J.*, vol. 213, pp. 225–234, 1983.
- [24] Da. F. Carmichael, J. E. Morin, and E. Dixon, "Purification and Characterization of a Thiol: Protein Disulfide Oxidoreductase from Bovine Liver," *J. Biol. Chem.*, vol. 252, no. 20, pp. 7163–7168, 1977.
- [25] A. P. Carvalho, P. a. Fernandes, and M. J. Ramos, "Similarities and differences in the thioredoxin superfamily," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 91, no. 3, pp. 229–248, 2006.
- [26] B. Van Den Berg, E. W. Chung, C. V Robinson, P. L. Mateo, and C. M. Dobson, "The oxidative refolding of hen lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase," *Embo. J.*, vol. 18, no. 17, pp. 4794–4803, 1999.
- [27] U. Grauschopf, J. R. Winther, P. Korber, T. Zander, P. Dallinger, and J. C. a Bardwell, "Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst?," *Cell*, vol. 83, no. 6, pp. 947–955, 1995.
- [28] M. Sone, Y. Akiyama, and K. Ito, "Differential in Vivo Roles Played by DsbA and DsbC in the Formation of Protein Disulfide Bonds," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 16, pp. 10349–10352, 1997.
- [29] S. Gleiter and J. C. a Bardwell, "Disulfide bond isomerization in prokaryotes," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1783, no. 4, pp. 530–534, 2008.
- [30] a Zapun, D. Missiakas, S. Raina, and T. E. Creighton, "Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*," *Biochemistry*, vol. 34, no. 15, pp. 5075–5089, 1995.
- [31] C. Guilhot, G. Jander, N. L. Martin, and J. Beckwith, "Evidence that the pathway of disulfide bond formation in *Escherichia coli* involves interactions between the cysteines of DsbB and DsbA," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 21, pp. 9895–9899, 1995.
- [32] J. C. Bardwell, J. O. Lee, G. Jander, N. Martin, D. Belin, and J. Beckwith, "A pathway for disulfide bond formation in vivo.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 3, pp. 1038–

- 1042, 1993.
- [33] U. Grauschopf, A. Fritz, and R. Glockshuber, "Mechanism of the electron transfer catalyst DsbB from *Escherichia coli*," *Embo. J.*, vol. 22, pp. 3505–3513, 2003.
- [34] P. H. Bessette, J. J. Cotto, H. F. Gilbert, and G. Georgieou, "In vivo and in vitro function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 12, pp. 7784–7792, 1999.
- [35] V. E. Shevchik, G. Condemine, and J. Robert-Baudouy, "Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity.," *EMBO J.*, vol. 13, no. 8, pp. 2007–2012, 1994.
- [36] X. X. Sun and C. C. Wang, "The N-terminal sequence (residues 1–65) is essential for dimerization, activities, and peptide binding of *Escherichia coli* DsbC," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 30, pp. 22743–22749, 2000.
- [37] J. Chen, J. L. Song, S. Zhang, Y. Wang, D. F. Cui, and C. C. Wang, "Chaperone activity of DsbC," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 28, pp. 19601–19605, 1999.
- [38] A. Hiniker and J. C. A. Bardwell, "In Vivo Substrate Specificity of Periplasmic Disulfide Oxidoreductases," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 13, pp. 12967–12973, 2004.
- [39] A. A. McCarthy, P. W. Haebel, V. Rybin, E. N. Baker, and P. Metcalf, "Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 196–199, 2000.
- [40] R. J. Dutton, D. Boyd, M. Berkmen, and J. Beckwith, "Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 33, pp. 11933–11938, 2008.
- [41] H. Kadokura and J. Beckwith, "Mechanisms of Oxidative Protein Folding in the Bacterial Cell Envelope," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 13, no. 8, pp. 1231–1246, 2010.
- [42] A. Hiniker, J. Collet, and J. C. A. Bardwell, "Copper Stress Causes an in Vivo Requirement for the *Escherichia coli* Disulfide Isomerase DsbC," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 40, pp. 33785–33791, 2005.
- [43] D. Missiakas, F. Schwager, and S. Raina, "Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in *Escherichia coli*," *EMBO J.*, vol. 14, no. 14, pp. 3415–3424, 1995.
- [44] E. Michel and K. Wüthrich, "Cell-free expression of disulfide-containing eukaryotic proteins for structural biology," *FEBS J.*, vol. 279, no. 17, pp. 3176–3184, 2012.
- [45] H. Safavi-Hemami *et al.*, "Modulation of Conotoxin Structure and Function Is Achieved through a Multienzyme Complex in the Venom Glands of Cone Snails," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 41, pp. 34288–34303, 2012.
- [46] S. R. Shouldice *et al.*, "In vivo oxidative protein folding can be facilitated by oxidation – reduction cycling," *Mol. Microbiol.*, vol. 75, no. 1, pp. 13–28, 2010.
- [47] S. A. Arredondo, T. F. Chen, A. F. Riggs, H. F. Gilbert, and G. Georgiou, "Role of Dimerization in the Catalytic Properties of the *Escherichia coli* Disulfide Isomerase DsbC," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 36, pp. 23972–23979, 2009.
- [48] Z. Zhao, Y. Peng, S. Hao, Z. Zeng, and C. Wang, "Dimerization by Domain Hybridization

- Bestows Chaperone and Isomerase Activities,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 44, pp. 43292–43298, 2003.
- [49] B. Ramírez-Cordero *et al.*, “Cytotoxicity of recombinant tamapin and related toxin-like peptides on model cell lines,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 27, no. 6, pp. 960–7, Jun. 2014.
- [50] A. Antonio-Pérez, T. Rivera-Hernández, L. M. Aldaz-Martínez, and J. Ortega-López, “Oxidative Refolding of Lysozyme Assisted by DsbA, DsbC and the GroEL Apical Domain Immobilized in Cellulose,” *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 710, pp. 703–710, 2012.
- [51] M. Luo, Y.-X. Guan, and S.-J. Yao, “On-column refolding of denatured lysozyme by the conjoint chromatography composed of SEC and immobilized recombinant DsbA,” *J. Chromatogr. B*, vol. 879, no. 28, pp. 2971–2977, 2011.
- [52] R. C. Davies, A. Neuberger, and B. M. Wilson, “The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 178, pp. 294–503, 1969.
- [53] P. Maurel and P. Douzov, “Catalytic Implications of Electrostatic Potentials : The Lytic Activity of Lysozyme as a Model,” *J. Biol. Chem.*, vol. 102, pp. 253–264, 1976.
- [54] L. Sheng, J. Wang, M. Huang, Q. Xu, and M. Ma, “The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 92, pp. 600–606, 2016.
- [55] H. Tomizawa, H. Yamada, and T. Imoto, “The Mechanism of Irreversible Inactivation of Lysozyme at pH 4 and 100 °C,” *Biochemistry*, vol. 33, no. 44, pp. 13032–13037, 1994.
- [56] M. Zhao, J. L. Bada, and T. I. M. J. Ahern, “Racemization Rates of Asparagine-Aspartic Acid Residues in Lysozyme at 100 °C as a Function of pH,” *Bioorg. Chem.*, vol. 40, pp. 36–40, 1989.
- [57] T. J. Ahern and A. M. Klibanov, “The Mechanism of Irreversible Enzyme Inactivation at 100 °C,” *Science (80-.)*, vol. 228, no. 2, pp. 1280–84, 1983.
- [58] B. A. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., “Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server,” in *The Proteomics Protocols Handbook*, J. M. Walker, Ed. Humana Press, 2005, pp. 571–607.
- [59] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price, “How to study proteins by circular dichroism,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1751, pp. 119–139, 2005.
- [60] Sigma-Aldrich, “Product information: Lysozyme from chicken egg white.”
- [61] J. C. F. De Winter, “Using the Student’s t-test with extremely small sample sizes,” *Pract. Assessment, Res. Eval.*, vol. 18, no. 10, pp. 1–12, 2013.
- [62] F. Tanaka, S. L. Forster, K. P. Pal, and A. J. Rupley, “The circular dichroism of lysozyme,” *J. Biol. Chem.*, vol. 250, no. 17, pp. 6977–6983, 1975.
- [63] S. J. Eyles, S. E. Radford, C. V. Robinson, and C. M. Dobson, “Kinetic Consequences of the Removal of a Disulfide Bridge on the Folding of Hen Lysozyme,” *Biochemistry*, vol. 33, no. 44, pp. 13038–13048, 1994.
- [64] H. Safavi-Hemami, Q. Li, R. L. Jackson, A. S. Song, and W. Boomsma, “Rapid expansion of the protein disulfide isomerase gene family facilitates the folding of venom peptides,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 12, pp. 3227–3232, 2016.

- [65] W. J. Wedemeyer, E. Welker, M. Narayan, and H. A. Scheraga, "Disulfide Bonds and Protein Folding," *Biochemistry*, vol. 39, no. 15, pp. 4207–4216, 2000.