

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA BETALACTAMASA DE
Pseudomonas fluorescens PRODUCIDA DE MANERA RECOMBINANTE EN
Escherichia coli BL21(DE3)**

JUAN MANUEL SÁNCHEZ GUERRERO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI**

2018

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA BETALACTAMASA DE
Pseudomonas fluorescens PRODUCIDA DE MANERA RECOMBINANTE EN
Escherichia coli BL21(DE3)**

JUAN MANUEL SÁNCHEZ GUERRERO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA**

DIRECTOR DEL PROYECTO

ARAM JOEL PANAY ESCOBAR, PhD.

SANTIAGO DE CALI

2018



APROBADO POR:

Maria Francisca Villegas

Maria Francisca Villegas Torres, Ph.D.
Evaluador

Aram Joel Panay Escobar, Ph.D.
Tutor del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Aram Joel Panay Escobar, por su inmenso apoyo y dedicación para el cumplimiento de este proyecto, brindándome las herramientas y conocimientos necesarios para culminar los objetivos establecidos.

A mis padres, por su apoyo moral, educación y especial atención en todas mis proyecciones planteadas en mi proceso educativo.

A mis compañeros del laboratorio de investigación en Biocatalizadores, por su ayuda incondicional en cada etapa del desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de pregrado, por su apoyo en cada una de las dificultades presentadas y su conocimiento en cada necesidad.

CONTENIDO

RESUMEN DEL TRABAJO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	14
2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia.....	14
2.2. Marco teórico y estado del arte.....	16
2.3. Objetivos.....	21
2.3.1. Objetivo general	21
2.3.2. Objetivos específicos	21
2.4. Metodología empleada	22
2.4.1. Transformación de los cultivos de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	22
2.4.1.1. Tratamiento de competencia bacteriana con cloruro de calcio 0,1M.....	22
2.4.1.2. Transformación bacteriana mediante choque térmico	22
2.4.2. Pruebas de expresión y solubilidad de la enzima recombinante por inducción a diferentes concentraciones de IPTG y temperaturas de crecimiento.....	23
2.4.2.1. Pruebas de expresión de los medios inducidos con IPTG.....	24
2.4.2.2. Pruebas de solubilidad de los medios inducidos con IPTG	25
2.4.3. Purificación de la betalactamasa recombinante por cromatografía de afinidad con resina de níquel.....	25
2.4.3.1. Extracción de la betalactamasa en su fracción soluble del cultivo con bacterias <i>E. coli</i> transformadas.....	26
2.4.3.2. Separación de la enzima de interés mediante cromatografía de afinidad con resina de níquel	26
2.4.4. Diálisis de la betalactamasa para la eliminación de sales y otras moléculas	27
2.4.5. Cuantificación de la betalactamasa mediante el método de Bradford	27
2.4.6. Ensayo cuantitativo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante con nitrocefina como sustrato.....	28

2.4.7.	Cálculo de parámetros cinéticos con los resultados experimentales de actividad enzimática para la betalactamasa recombinante.	29
2.5.	Resultados.....	32
2.5.1.	Transformación de los cultivos de <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).	32
2.5.2.	Pruebas de expresión de los medios inducidos con IPTG	32
2.5.2.1.	Pruebas de solubilidad de los medios inducidos con IPTG.	36
2.5.3.	Purificación de la betalactamasa recombinante por cromatografía de afinidad con resina de níquel.....	40
2.5.4.	Diálisis de la betalactamasa para la eliminación de sales y otras moléculas.	42
2.5.5.	Cuantificación de la betalactamasa mediante el método de Bradford	43
2.5.6.	Ensayo cuantitativo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante con nitrocefina como sustrato.	45
2.5.7.	Cálculo de parámetros cinéticos con los resultados experimentales de actividad enzimática para la betalactamasa recombinante.	47
2.6.	Discusión	50
2.7.	Conclusiones	55
2.8.	Recomendaciones	56
2.9.	Referencias.....	57

Lista de Tablas

Tabla 1. Parámetros cinéticos de diferentes betalactamasas a diferentes sustratos (Michaux, y otros, 2008)	19
Tabla 2. Concentraciones de IPTG y temperaturas a evaluar.....	23
Tabla 3. Volúmenes de IPTG adicionados a partir de la solución madre.	24
Tabla 4. Disoluciones para la construcción de la curva de calibración de BSA.....	27
Tabla 5. Composición de las soluciones de ensayo para cada concentración de nitrocefina.	28
Tabla 6. Matriz de marco lógico para la realización del proyecto de grado.	29
Tabla 7. Observaciones de los controles de selección para el método de transformación empleado	32
Tabla 8. Dilución de la concentración de imidazol en la diálisis de la betalactamasa obtenida en el proceso de purificación.....	42
Tabla 9. Concentraciones y absorbancias determinadas en la cuantificación por Bradford.....	44
Tabla 10. Parámetros cinéticos de la betalactamasa recombinante de <i>P. fluorescens</i> almacenada a 4°C.....	47
Tabla 11. Parámetros cinéticos de la betalactamasa recombinante de <i>P. fluorescens</i> almacenada a -80°C.....	49
Tabla 12. Parámetros cinéticos experimentales y teóricos de la betalactamasa recombinante de <i>P. fluorescens</i>	49
Tabla 13. Reactivos requeridos para la preparación del gel de electroforesis SDS-PAGE.....	59

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Curva de calibración de BSA para la cuantificación de la betalactamasa.	43
Gráfica 2. Ensayo de actividad enzimática con la betalactamasa almacenada a 4°C, a una concentración de nitrocefina de 63µM.	45
Gráfica 3. Cinética de Michaelis-Menten de la betalactamasa recombinante almacenada a 4°C.	46
Gráfica 4. Cinética de Michaelis-Menten de la betalactamasa recombinante almacenada a 4°C.	46
Gráfica 5. Cinética de Michaelis-Menten de la betalactamasa recombinante almacenada a -80°C.	47

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química de los antibióticos betalactámicos	16
Figura 2. Mecanismo de síntesis de la pared bacteriana	17
Figura 3. Mecanismo de acción de las betalactamasas	18
Figura 4. Unión entre el ácido nitrilotriacético y la cola de histidinas de una proteína recombinante	20
Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. 37° - IPTG 0,2mM.....	33
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. 37° - IPTG 0,6mM.....	33
Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. 37° - IPTG 0,8mM.....	34
Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. 37° - IPTG 1.0mM.....	34
Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. ambiente (27°C) - IPTG 0.2mM.	34
Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. ambiente (27°C) - IPTG 0.6mM.....	35
Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. ambiente (27°C) - IPTG 0.8mM.....	35
Figura 12. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. ambiente - IPTG 1.0mM.	36
Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. 18°C - IPTG 0.2, 0.6, 0.8, 1.0mM.....	36
Figura 14. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. 37°C - IPTG 0.2, 0.6mM.....	37
Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. 37°C - IPTG 0.6, 0.8mM.....	37
Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. 37°C - IPTG 1.0mM.....	38
Figura 17. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. ambiente - IPTG 0.2, 0.6mM.....	38
Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. ambiente - IPTG 0.6, 0.8mM.....	39
Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. ambiente - IPTG 1.0mM.	39
Figura 20. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. 18°C - IPTG 0.2, 0.6, 0.8mM.....	40
Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. 18°C - IPTG 0.8, 1.0mM.....	40
Figura 22. Electroforesis SDS-PAGE con los pasos de purificación de la enzima recombinante por cromatografía de afinidad, a un cultivo de 250mL de E. coli.	41
Figura 23. Columna cromatográfica de Sigma-Aldrich empleada en la purificación de la enzima recombinante.....	52
Figura 24. Dispositivo de filtro centrífugo Amicon® Ultra-15 10K.....	53
Figura 25. Estructura química de la nitrocefina.	54

Lista de Anexos

Preparación del gel de electroforesis SDS-PAGE.....	60
---	----

RESUMEN DEL TRABAJO

Los mecanismos de resistencia bacteriana representan uno de los mayores desafíos para desarrollar estrategias en el uso de antibióticos betalactámicos. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto es determinar los parámetros cinéticos de la betalactamasa recombinante de *Pseudomonas fluorescens*, determinando las constantes cinéticas de velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis (K_M), con el propósito de proveer información respecto al comportamiento y la actividad de dicha enzima.

Estudios anteriores realizados en el trabajo de grado “CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA BETALACTAMASA DE *Pseudomonas fluorescens* PRODUCIDA DE FORMA RECOMBIANTE”, demostraron la expresión abundante de la betalactamasa de *Pseudomonas fluorescens* por transformación de *E. coli*. No obstante, la inducción de expresión del gen a IPTG 0.2mM y 37°C, evidenció problemas de solubilidad. Además, no se contó con una metodología eficiente para determinar los parámetros cinéticos, con ampicilina como sustrato. A partir de lo anterior, en este trabajo se determinó las condiciones óptimas de expresión y solubilidad de dicha enzima, variando la concentración de IPTG y la temperatura de crecimiento; y con estas condiciones, se logró separar y purificar la enzima mediante cromatografía de afinidad. Finalmente, se usó un sustrato cromogénico, nitrocefina, para determinar la actividad de la enzima.

Inicialmente, mediante transformación de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido comercial pET-21b Pfluor-Betalac, se obtuvo las bacterias recombinantes. Posteriormente, las pruebas de expresión y solubilidad determinaron que, a 0,2mM del inductor IPTG, temperatura ambiente y 4 horas posteriores a la inducción, la cantidad de enzima en su fracción soluble era mayor. Luego, mediante cromatografía de afinidad, se purificó la enzima en un cultivo de 250mL, cuya eficiencia fue cercana al 90%, determinando una concentración de 1.7mM por cuantificación por Bradford. Finalmente, con los ensayos de actividad enzimática, a partir de diferentes concentraciones de sustrato en tiempos de reacción, se obtuvo un $K_M=111.2\mu\text{M}$, $V_{max}=0.1901\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$, $K_{cat}=223.38\text{s}^{-1}$ y $K_{cat}/K_M=2.01\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$, corroborando que están dentro de los rangos reportados para esta enzima, producida de forma recombinante.

Se espera que, con estos resultados, se empleen las condiciones óptimas establecidas para la obtención de la enzima en su forma activa. Además, mediante la determinación de sus parámetros cinéticos, se prediga el comportamiento de la betalactamasa, con el objetivo de diseñar estrategias de inhibición enzimática para el desarrollo de antibióticos betalactámicos más eficientes.

Palabras Clave: Betalactamasa, transformación, cromatografía de afinidad, actividad enzimática.

ABSTRACT

The mechanisms of bacterial resistance represent one of the main challenges for the development of strategies in the use of beta-lactam antibiotics. Therefore, the objective of this project is to determine the kinetic parameters of the recombinant beta-lactamase of *Pseudomonas fluorescens*, determining the kinetic constants of maximum rate (V_{max}) and Michaelis constant (K_M), with the purpose of providing information to the behavior and activity of the enzyme.

Previous studies carried out in the work "KINETIC CHARACTERIZATION OF BETALACTAMASE OF *Pseudomonas fluorescens* PRODUCED RECOMBINANTLY", demonstrated the abundant expression of the beta-lactamase of *Pseudomonas fluorescens* by transformation of *E. coli*. However, the induction of expression of the gene to IPTG 0.2mM and 37°C, showed problems of solubility. In addition, there was no efficient methodology to determine the kinetic parameters, with ampicillin as a substrate. From the above, in this work the optimal conditions of expression and solubility of the beta-lactamase were determined, varying the IPTG concentration and the expression temperature; and with these conditions, the enzyme was separated and purified by affinity chromatography. Finally, a chromogenic substrate, nitrocefin, was used to determine the activity of the enzyme.

Initially, by the transformation of *E. coli* BL21(DE3) with the commercial plasmid pET-21b Pfluor-Betalac, the recombinant bacteria were obtained. Subsequently, the expression and solubility tests determined that, 0.2mM of the IPTG inducer, ambient temperature and 4 hours after induction, the amount of enzyme in soluble fraction was highest. Then, by affinity chromatography, the enzyme was purified in a 250mL culture, whose efficiency was close to 90%, determining a concentration of 1.7mM by quantification by Bradford. Finally, with enzymatic activity assays, $K_M=111.2\mu\text{M}$, $V_{max}=0.1901\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$, $K_{cat}=223.38\text{s}^{-1}$ and $K_{cat}/K_M=2.01\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ were obtained, corroborating that they are inside of the ranges reported for this enzyme, production of recombinant form.

It is expected that, with the previous studies, the optimal conditions established for obtaining the enzyme in its active form will be applied. In addition, with determining kinetic parameters, predict the behavior of beta-lactamase, with the aim of designing enzymatic inhibition strategies for the development of more efficient beta-lactam antibiotics.

Keywords: Beta-lactamase, transformation, affinity chromatography, enzymatic activity.

1. INTRODUCCIÓN

La evolución clínica de los antibióticos llegó a ser tan prevalente para la industria farmacéutica, que constituía uno de los tratamientos más prescritos, tanto en atención primaria, como en hospitales. El descubrimiento de la penicilina por Sir Alexander Fleming en 1928 fue tan influyente para las ciencias de la salud, que abrió la era moderna de la innovación y el desarrollo de los antibióticos, llegando a formularse, no solo en humanos, sino también en cría de animales y agricultura (Yang, y otros, 2018). Sin embargo, la resistencia bacteriana contra estos fármacos, así como la aparición y adquisición de nuevos mecanismos de supervivencia de diferentes patógenos, contra tratamientos utilizados en la práctica clínica, se han convertido en un problema a nivel mundial, especialmente por la dificultad en la detección por el laboratorio de los diferentes perfiles de resistencia (Secretaría Distrital de Salud, 2010).

Los antibióticos betalactámicos (como las penicilinas) constituyen el grupo de antibióticos más extenso y prolífico, representando el 50-70% del consumo total de estos fármacos. Estas se caracterizan por el anillo betalactámico fusionado con un grupo representativo para cada molécula (Chen, Wang, Qian, & Huang, 2017); este primero constituido por cuatro átomos (tres de carbono y uno de nitrógeno). La efectividad de este tipo de fármacos se ha visto disminuida por la presencia de betalactamasas, el método más común de resistencia bacteriana. Estas enzimas hidrolizan el anillo lactámico de estos antibióticos, generando productos que son privados de la actividad antimicrobiana. Para la búsqueda de posibles inhibidores de estas enzimas, la investigación científica primero se ha dado la tarea de entender su mecanismo de acción y comportamiento cinético. Este último se encarga de predecir la actividad de estas moléculas, a partir de la determinación de parámetros cinéticos que definen características en particular: constante de Michaelis (K_M), velocidad máxima de reacción enzimática (V_{max}), constante catalítica (K_{cat}) y constante de especificidad (K_{cat}/K_M). De esta manera, si se requiere corroborar la actividad enzimática de las betalactamasas que se obtienen de manera recombinante, estos parámetros constituyen una buena referencia.

El desarrollo del proyecto de grado realizado en la Universidad Icesi, “CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA BETALACTAMASA DE *Pseudomonas fluorescens* PRODUCIDA DE FORMA RECOMBIANTE”, tuvo como objetivo caracterizar cinéticamente la betalactamasa de *Pseudomonas fluorescens*, produciéndola de forma recombinante. Los resultados evidenciaron un método de transformación bacteriano exitoso, mediante choque térmico a 42°C. No obstante, los análisis de solubilidad de la enzima mostraron cantidades pequeñas de esta en forma activa. Por otro lado, la purificación de la enzima mediante cromatografía de afinidad se hizo exitosa para un volumen de cultivo pequeño, cuya cantidad de enzima resultó ser insuficiente para los ensayos de actividad enzimática, los cuales se vieron claramente afectados por el método colorimétrico empleado con rojo de fenol y ampicilina como sustrato.

Con base en lo anterior, se desarrolló una metodología que permitiese obtener los parámetros cinéticos de la enzima recombinante, mediante cultivos de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformados con el plásmido utilizado en el trabajo anterior. Para ello, se realizaron pruebas de expresión y solubilidad de dicha enzima, variando la concentración del inductor de expresión IPTG y la temperatura de crecimiento posterior a esta inducción. El objetivo de evaluar este último parámetro fue buscar una posible disminución del estrés metabólico, producido al añadir concentraciones de IPTG considerables que impulsen la formación de los cuerpos de inclusión a 37°C. De esta manera, disminuyendo la temperatura, la cinética de crecimiento bacteriano y expresión del gen se harían más lentas, permitiendo un correcto plegamiento de la enzima que pudiese ser activa para posteriores análisis.

Por otro lado, se realizaron los ensayos de actividad enzimática empleando nitrocefina, un sustrato con característica de ser cromogénico (cambia de color cuando es hidrolizado por la enzima). De esta manera, la coloración obtenida sería fácilmente medible en el espectrofotómetro, para determinar absorbancias más precisas, que permitan analizar cinéticas de tipo Michaelis-Menten, para la obtención de los parámetros cinéticos: objetivo general del presente trabajo.

Con los resultados obtenidos, se pretende evaluar el comportamiento y actividad de la betalactamasa de *Pseudomonas fluorescens* obtenida de forma recombinante y, de esta manera, contribuir al desarrollo de estrategias en el uso de antibióticos betalactámicos que sean resistentes a este tipo de enzimas. Mediante la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima recombinante, se espera que pueda ser empleada en estudios de inhibición que se desarrollen en trabajos posteriores, y que esta pueda ser obtenida de manera experimental, evitando costos altos en la adquisición de esta molécula de forma comercial. Además, el alcance de este proyecto les permitiría a los investigadores obtener cantidades deseadas de esta betalactamasa, para estudios relacionados.

Se espera que la contribución de este proyecto permita mejorar el panorama que se presenta, tanto a nivel nacional como internacional, la resistencia bacteriana que afecta a gran parte de la población con este tipo de patógenos, cuyo tratamiento se ve delimitado por la producción masiva de este tipo de enzimas.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia.

La práctica clínica, junto con las investigaciones farmacéuticas, han dado progresivos avances terapéuticos para el control de enfermedades infecciosas causadas por diferentes microorganismos. Los antibióticos betalactámicos se han convertido en el grupo antimicrobiano más extenso y prolífico de los que integran hoy el grupo terapéutico de fármacos contra infecciones bacterianas. El anillo betalactámico de estos permite inhibir la síntesis de la pared bacteriana de algunos patógenos, impidiendo su proliferación en el organismo y mejorando las condiciones de vida de los pacientes. Su creciente campo de investigación ha permitido desarrollar diferentes antibióticos, acorde a la naturaleza de sus radicales o sustituyentes, que determinan la toxicidad, farmacocinética y actividad antimicrobiana (Gómez, García Vázquez, & Hernández Torres, 2015).

Con el uso continuo de antibióticos betalactámicos en prácticas clínicas y como mecanismo de defensa de algunas bacterias, se han desarrollado diferentes vías de resistencia bacteriana por parte de éstas, entre las que se encuentran las betalactamasas, que destruyen la integridad estructural de estos antibióticos, hidrolizando el anillo betalactámico y produciendo otras moléculas que son privadas de la actividad antimicrobiana que realizaban anteriormente; y de esta manera, las bacterias sobreviven en cualquier ambiente que les sea favorecido para su supervivencia (Abarca & Herrera, 2001). Debido a que la actividad y el comportamiento de las betalactamasas en diferentes microorganismos son considerablemente diferentes, esta se ve reflejada en la determinación de sus parámetros cinéticos, dado que provee información necesaria respecto a la velocidad e interacción con un sustrato en particular.

Las investigaciones realizadas anteriormente en el trabajo de grado “Caracterización cinética de la betalactamasa de *Pseudomonas fluorescens* producida de forma recombinante” realizado por las estudiantes Laura Marcela Valencia y Tatiana Castro Campo (estudiantes egresadas del programa de Química), permitieron evidenciar una alternativa para obtener la betalactamasa de *P. fluorescens* mediante transformación por choque térmico, con el objetivo de purificarla y determinar sus parámetros cinéticos para proveer información de actividad enzimática de la misma. Sin embargo, los ensayos de solubilidad de la enzima inducida a diferentes concentraciones de IPTG, bajo temperatura de crecimiento constante (37°C), no lograron establecer condiciones óptimas de expresión que permitían obtener la enzima en cantidades considerables, en forma soluble y activa. La cantidad de enzima obtenida en cultivos de 250mL y 500mL, permitió purificarse mediante cromatografía de afinidad, pero no fue posible realizar un estudio de actividad enzimática, debido a la ineficiencia del método

empleado, empleando ampicilina como sustrato y rojo de fenol como indicador colorimétrico.

A partir del planteamiento anterior, este proyecto de grado buscó establecer las condiciones óptimas de expresión y solubilidad de la betalactamasa recombinante de *P. fluorescens*, variando la concentración de IPTG y temperaturas de crecimiento posteriores a la inducción de expresión, respondiendo a la pregunta de investigación: ¿Cómo varía la cantidad de enzima en su fracción soluble y activa, a cambios en concentración de IPTG y temperaturas de crecimiento posteriores a la inducción?, con el fin de evaluar cambios a favor de la cantidad de esta, bajo la hipótesis de que las proteínas inducidas con IPTG presentan mejor solubilidad a temperaturas más bajas, debido a la disminución del estrés metabólico que causa la formación de cuerpos de inclusión.

La nitrocefina se conoce como un sustrato de betalactamasas que tiene la capacidad de generar una coloración amarillo – rojiza cuando es hidrolizada por estas enzimas. Con las condiciones óptimas que se obtuvieron en la hipótesis anterior, se buscó purificar la enzima obtenida mediante cromatografía de afinidad, evaluando, posteriormente, la actividad enzimática de manera cuantitativa a diferentes concentraciones de nitrocefina, para determinar parámetros cinéticos de constante de Michaelis (K_M) y velocidad máxima de reacción (V_{max}). Lo anterior respondió a la pregunta de investigación: ¿Es activa enzimáticamente la betalactamasa recombinante obtenida en fracción soluble? El proyecto evaluará si el uso de este sustrato permitía obtener valores de absorbancias más precisas del producto hidrolizado, debido a la coloración fácilmente medible en el espectrofotómetro, con el fin de caracterizar cinéticamente la enzima y obtener parámetros cinéticos que se encontraran dentro del rango reportando en la literatura.

La importancia de entender los parámetros cinéticos radica en que, la velocidad máxima de reacción enzimática fue un factor que permitió identificar la tasa de saturación de la betalactamasa cuando reaccionaba con la nitrocefina, a un tiempo determinado, correspondiente a una propiedad intrínseca dependiente de la cantidad de enzima que estaba trabajando. Por otro lado, la constante de Michaelis proporcionó información respecto a la concentración de nitrocefina a la cual la velocidad inicial era la mitad de la velocidad máxima de saturación. De esta manera, fue posible determinar otros parámetros, como el número de recambio (K_{cat}), y la constante de especificidad (K_{cat}/K_m), que indicó qué tan específica fue la enzima por la nitrocefina. Esta información será importante para futuras investigaciones relacionadas con inhibidores competitivos de la betalactamasa, para el desarrollo de estrategias en el uso de antibióticos betalactámicos.

2.2. Marco teórico y estado del arte.

Ha pasado casi medio siglo desde que se introdujo a la medicina la penicilina como tratamiento antimicrobiano. No mucho antes, las respuestas a las sulfonamidas de pacientes que tenían fiebre puerperal y otros peligros para la salud causados por estreptococos habían mostrado, en primera instancia, el uso efectivo de moléculas pequeñas para el tratamiento general de infecciones bacterianas. Muchas de las prácticas clínicas actuales no tienen memoria de un momento anterior en el que no se contaba con los recursos suficientes para tratar a pacientes con infecciones clínicas graves. (Abraham, 1980).

Después de casi 70 años en investigación clínica y farmacológica, los antibióticos betalactámicos han sido los más prescritos en la práctica clínica. Su característica particular es la presencia del anillo lactámico, el cual determina el mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de la pared celular), la escasa toxicidad directa (actúa sobre la pared celular del microorganismo que no está presente en la célula eucariota animal) y el principal mecanismo de resistencia (las betalactamasas). No obstante, para que este fármaco sea activo, es preciso que esté unido a otros radicales (habitualmente otros anillos). La asociación de diferentes tipos de cadenas lineales, junto con las características propias de este esqueleto básico formado por 2 anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactamas (Figura 1). Dentro de cada grupo, pequeñas alteraciones en la estructura química son capaces de modificar las características del antibiótico, como el espectro, la afinidad por determinados receptores o la resistencia a las betalactamasas (Suárez & Gudiol, 2009).

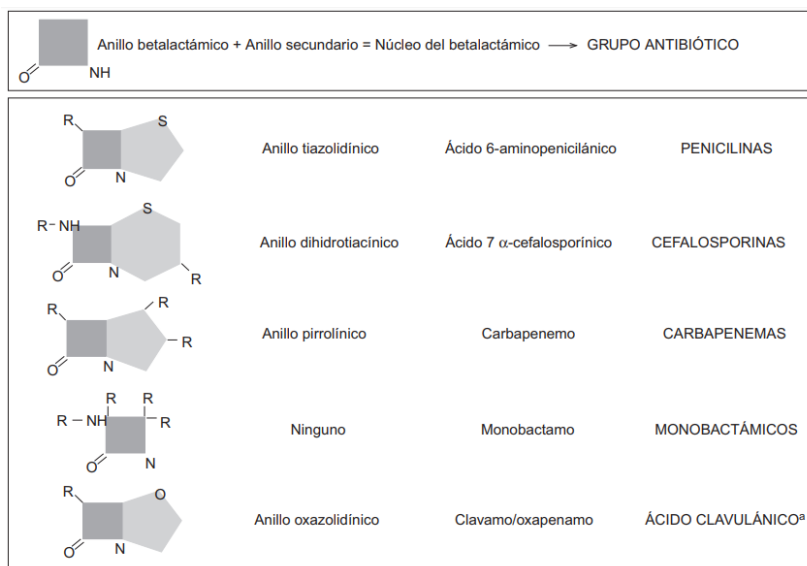


Figura 1. Estructura química de los antibióticos betalactámicos (Suárez & Gudiol, 2009)

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto, principalmente, a través de 2 mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana. La pared bacteriana es una estructura que envuelve las bacterias de todos los géneros, excepto los microplasmias; se sitúa por fuera de la membrana citoplásmica y está compuesta principalmente por una proteína llamada peptidoglucano. En las bacterias Gram positivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es dicha proteína. Las bacterias Gram negativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas, y de una capa interna delgada de peptidoglucano. Las bacterias ácido alcohol resistente tienen una pared similar a la de los microorganismos Gram positivos, pero con una capa de peptidoglucano fina y, por fuera, una capa muy rica en lípidos (García Sánchez, y otros, 1999)

La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos (mediante la pérdida de uno de los aminoácidos terminales), para lo que se necesita la acción de unas enzimas que localizan este espacio periplásmico, llamadas de forma genérica transpeptidasas (Figura 2). El anillo betalactámico que presenta los antibióticos de esta familia presenta una estructura similar a la región del pentapéptido al que se unen las enzimas, también denominadas PBP (*penicilin binding protein* "proteína ligada a la penicilina"). Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica. Por tanto, para que actúen estos antibióticos, es preciso que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que éste es el momento en que se sintetiza la pared celular (Suárez & Gudiol, 2009).

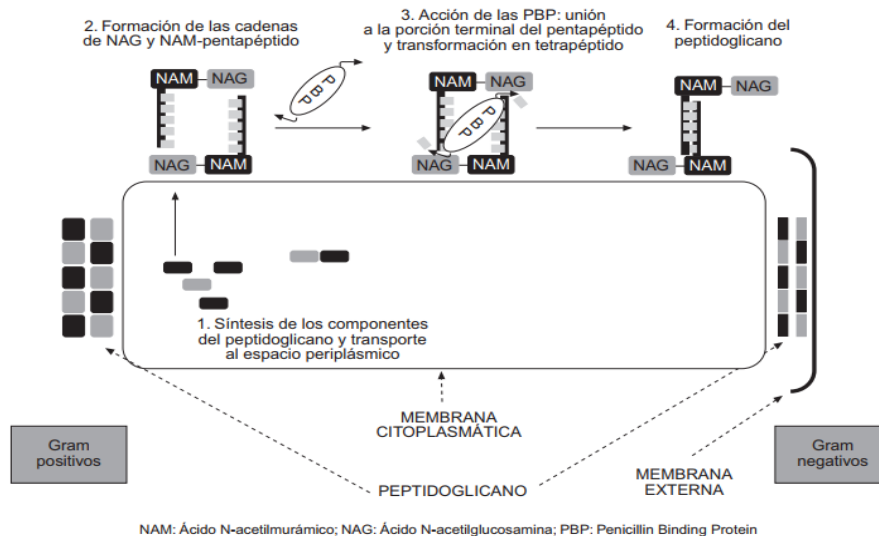


Figura 2. Mecanismo de síntesis de la pared bacteriana (Suárez & Gudiol, 2009).

Los mecanismos de resistencia bacterianos se centran en cuatro principales: bloqueo de transporte, cambio de los sitios de acción, bombas de flujo y producción de enzimas betalactamasas, siendo esta última la más significativa

para la resistencia a antibióticos betalactámicos (Figura 3). Estas enzimas hidrolizan el anillo β -lactámico de estos fármacos y los convierte en compuestos que son biológicamente inactivos, privados de la actividad antimicrobiana (C. Rodríguez, S. Ahammad, A. Peñuela, & W. Graham, 2018). La primera evidencia de la presencia de estas enzimas en *Escherichia coli* se remonta a los años 60 del pasado siglo, cuando se describió la betalactamasa TEM-1.

Un grupo importante de estas enzimas son las BLEE (betalactamasas de espectro extendido) que tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia a penicilinas, oximini-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam). Tienen la característica de ser originarias a través de mutaciones espontáneas de betalactamasas de espectro reducido, a través de cambios en los sitios activos de aminoácidos, lo que permite que su capacidad hidrolítica se expanda. Lo anterior se corrobora por la homología relativamente baja que presentan (25%) (Reinthalder, y otros, 2010). Los genes que las codifican se encuentran en elementos móviles que facilitan su diseminación y con frecuencia presentan co-resistencia a otros antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas (Calvo, Cantón, Fernández Cuenca, Mirelis, & Navarro, 2011).

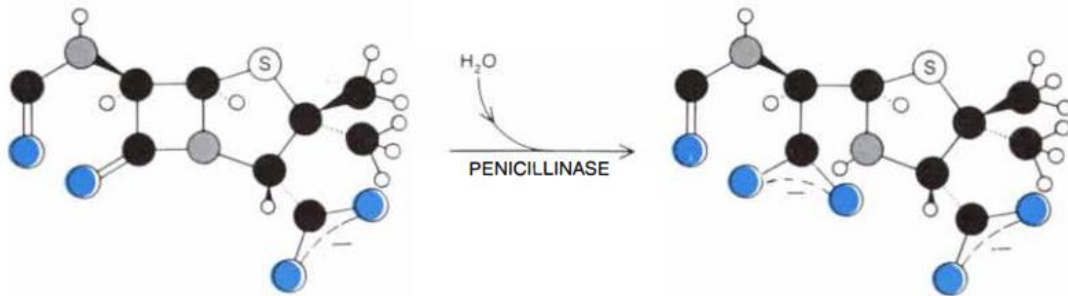


Figura 3. Mecanismo de acción de las betalactamasas (Abraham, 2000)

Se han identificado más de 80 betalactamasas diferentes, y se han dividido en tres clases (A, B y C). La mayoría de estas moléculas se han caracterizado como enzimas de serina en el sitio activo que pertenecen a las clases A y C. Por otra parte, las pertenecientes a la clase B constituyen aquellas que requieren zinc en su centro activo para desarrollar actividad enzimática. También se conoce una DD-peptidasa de zinc, el cual cataliza reacciones de carboxipeptidación y no se une a la penicilina. Se han conocido datos estructurales tridimensionales para las serinas de las betalactamasas que la contienen, con el objetivo de proveer información funcional de estas enzimas (Kelly, y otros, 2014)

Debido a la problemática que ha causado la presencia de betalactamasas en pacientes con problemas clínicos que no tienen efectividad en el tratamiento con antibióticos de este tipo, se ha optado por realizar numerosas investigaciones para el estudio del comportamiento de la actividad enzimática de las betalactamasas. Normalmente, estos estudios involucran conocimiento respecto a los parámetros

cinéticos que las identifican, siendo diferentes para cada enzima que produce diferentes microorganismos. Estos parámetros varían, además, del sustrato al cual se evalúa.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de diferentes betalactamasas a diferentes sustratos (Michaux, y otros, 2008)

Substrate	<i>Pse. fluorescens</i> TAE4			<i>Psy. immobilis</i> ^a			<i>E. cloacae</i> 908R	
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)
Nitrocefin	550 ^b	116 ^b	4.75	1407	51	27.6	780 ^e	23 ^e
Cephalexin	31 ^c	50 ^c	0.63	26	8	3.3	72 ^e	8.5 ^e
Cefazolin	> 61 ^b	> 150 ^b	0.41	476	100	4.8	3000 ^e	1500 ^e
Benzylpenicillin	34.3 ^c	2.3 ^d	34.3	20	1.7	11.8	18 ^f	0.5 ^f
Ampicillin	0.65 ^c	5.1 ^d	0.65	1	6	0.16	0.53 ^f	0.4 ^f
Carbenicillin	0.52 ^c	3.7 ^d	0.14	-	-	-	0.004 ^f	0.004–0.011 ^f
Oxacillin	0.21 ^c	0.118 ^d	1.78	-	-	-	0.008 ^f	0.0006–0.0011 ^f
Cloxacillin	0.42 ^c	0.016 ^d	27.1	-	-	-	0.004 ^f	0.0005 ^f

^a Data from [38]. ^b Complete time-courses [42]. ^c Initial rates. ^d Substrate competition. ^e Data from [43]. ^f Data from [54].

Las reacciones globales que involucran enzimas presentan un mecanismo en general:



Donde E, S y P representan la enzima, el sustrato y el producto, respectivamente. Los estudios de cinética enzimática -el método más antiguo para estudiar mecanismos de reacción enzimáticos- consisten en determinar la velocidad de la reacción y del modo en que ésta cambia en respuesta a cambios en los parámetros experimentales (Lehninger, Nelson, & Cox, 2007). Estos parámetros delimitan el comportamiento de una enzima en particular, y caracterizan la forma en que ésta actúa bajo diferentes factores externos.

Uno de los factores relevantes en la velocidad de las reacciones, es la concentración de sustrato [S] presente. El efecto de la variación en dicha concentración sobre la velocidad inicial (V_0) de las reacciones catalizadas por enzimas, permiten determinar la velocidad máxima de reacción enzimática (V_{max}), conocido como el punto de equilibrio, donde los incrementos de V_0 a medida que aumenta [S] son insignificantes. Se dice que, en este punto, todos los centros activos de la enzima se encuentran saturados u ocupados, interaccionando con el sustrato. Del análisis anterior, la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de V_{max} , se conoce como la constante de Michaelis (K_M), un parámetro característico para cada enzima que actúa sobre un sustrato determinado (Lehninger, Nelson, & Cox, 2007).

De los parámetros cinéticos mencionados anteriormente se derivan otros más, los cuales predicen la eficiencia de la enzima. El número de recambio K_{cat} , determina el número de moléculas de sustrato que una molécula de enzima (independiente de su concentración), en condiciones de saturación, puede convertir en producto,

por unidad de tiempo, siendo también un parámetro único para cada enzima. Finalmente, la constante de especificidad (K_{cat}/K_M), proporciona una buena medida de la eficiencia catalítica de una enzima (Lehninger, Nelson, & Cox, 2007).

Los estudios que determinen la cinética enzimática de las betalactamasas proporcionarán información directa respecto al mecanismo de la reacción catalítica y la especificidad de la enzima. De esta manera, al conocer la interacción enzima sustrato, velocidad máxima de reacción y afinidad que tiene la molécula con el sustrato, será posible realizar estudios de inhibición enzimática competitiva mediante interacción con otras moléculas más afines a la enzima. Por otro lado, tomaría como reto comprobar el potencial inhibitorio de ciertos fármacos candidatos o evaluar matrices poliméricas anfífilas que eviten la degradación del antibiótico betalactámico, o que encapsulen la betalactamasa para detener su actividad enzimática. Para este fin se pueden comparar los valores de parámetros cinéticos al medirlos con la enzima inhibida, junto con la nitrocefina como sustrato empleado en el proyecto de grado, para ver cómo éstos se ven afectados por la presencia de inhibidor (Castro Campo & Valencia Torres, 2016).

Dicho procedimiento implica obtener la enzima de manera recombinante, a través de un huésped receptor del plásmido empleado para tal fin. Los estudios de actividad requieren un extracto enzimático puro, que no contenga moléculas que interfieran con la actividad específica de la molécula. Este proceso se realiza bajo cromatografía de afinidad con resina de níquel, el cual se emplea un sistema de unión entre un agente quelante tetradentado (ácido nitrilotriacético) y una cola de histidinas que produce la enzima recombinante. Esta unión covalente permite realizar lavados correspondientes a la solución, separando las moléculas que no hacen parte de este sistema (Figura 4). Finalmente, mediante un sustrato característico de poseer un anillo lactámico, como nitrocefina, se realizan estudios de actividad enzimática que determinan los parámetros cinéticos experimentales de la molécula, esenciales para futuras investigaciones de fármacos potenciales contra resistencias bacterianas (Castro Campo & Valencia Torres, 2016).

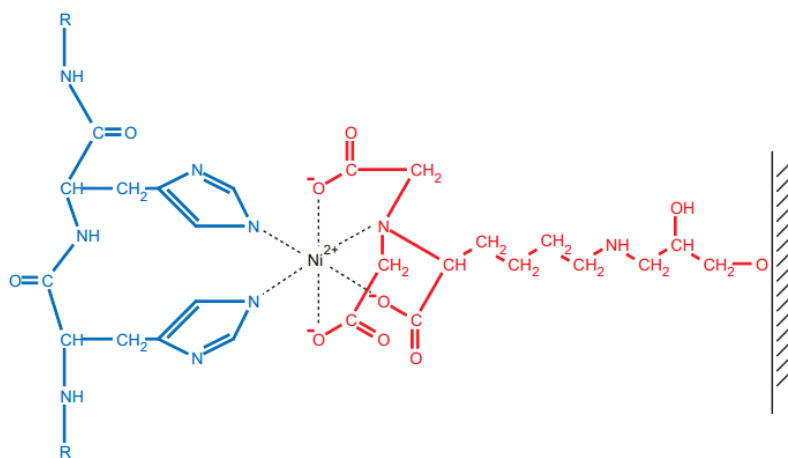


Figura 4. Unión entre el ácido nitrilotriacético y la cola de histidinas (QIAGEN, 2003)

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Determinar los parámetros cinéticos de la betalactamasa de *Pseudomonas fluorescens* producida de forma recombinante en *E. coli*, a partir de las constantes cinéticas de velocidad máxima de reacción enzimática (V_{max}) y constante de Michaelis (K_M).

2.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar las condiciones óptimas de expresión y solubilidad de la betalactamasa recombinante de *Pseudomonas fluorescens*.

Indicadores:

- Bandas en geles de electroforesis SDS-PAGE con la mayor cantidad de enzima expresada identificadas.
 - Bandas en geles de electroforesis SDS-PAGE con la mayor cantidad de enzima expresada en su fracción soluble identificadas.
- ✓ Separar y purificar la enzima betalactamasa de *Pseudomonas fluorescens* recombinante mediante la técnica de cromatografía de afinidad con resina de níquel.

Indicadores:

- Fracciones en las eluciones de la columna cromatográfica de Sigma-Aldrich obtenidas
 - Banda en gel de electroforesis SDS-PAGE con las eluciones que contienen la mayor cantidad de enzima pura identificadas.
- ✓ Evaluar la actividad enzimática de la betalactamasa de *Pseudomonas fluorescens* recombinante, utilizando como sustrato cromogénico Nitrocefina.

Indicadores:

- Ensayos cuantitativos de actividad enzimática con Nitrocefina realizados.
- Gráfica de Michaelis-Menten con las diferentes concentraciones de sustrato obtenida.

2.4. Metodología empleada

El proyecto de grado se realizó en el laboratorio 105L de investigación en bioquímica de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Icesi. Este espacio está asignado al grupo de investigación en biocatalizadores, dirigido por el docente Aram Joel Panay Escobar.

2.4.1. Transformación de los cultivos de *Escherichia coli* BL21(DE3)

2.4.1.1. Tratamiento de competencia bacteriana con cloruro de calcio 0,1M

La competencia celular se produce a través de tratamientos con cloruro de calcio, a cambios bruscos de temperatura; por ejemplo, de -80°C a una de 42°C , con el uso de iones Ca^{2+} , que cambian la carga eléctrica de la membrana al recubrir las cabezas polares de lípidos, lo que disminuye la repulsión de cargas eléctricas entre los fosfatos de los nucleótidos y la membrana, además de facilitar la entrada del plásmido al interior celular (BIOQUIMEXPERIMENTAL, 1995).

Este proceso se llevó a cabo, tomando 5mL de un cultivo de bacterias *E. coli* BL21(DE3) almacenadas en el Ultra Refrigerador (-80°C). Esta muestra se llevó a 4°C por 10 minutos, centrifugando a 3000RPM con las mismas condiciones anteriores, empleando la centrífuga eppendorf® 5804 R. Una vez eliminado el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 5mL de CaCl_2 0.1M, donde se dejó incubando por 20 minutos en hielo, con el fin de que la solución tenga su efecto en las bacterias. Estos dos últimos pasos se realizaron por duplicado, disminuyendo la cantidad del reactante (cloruro de calcio) a 0.5mL en la segunda repetición. Para llevar a cabo un mejor cuidado de las bacterias competentes, se realizó alícuotas de $100\mu\text{L}$ en tubos eppendorf y se almacenaron en el Ultra Refrigerador a -80°C .

2.4.1.2. Transformación bacteriana mediante choque térmico

Los fenómenos de transformación bacteriana permiten introducir un plásmido (pequeña molécula de DNA circular) fabricado, dentro de las bacterias que han sido previamente tratadas para ser competentes. El proceso de transformación que incluye la introducción de DNA exógeno en las células bacterianas tiende a que éste último pase a ser parte del material genético de la bacteria, pudiendo ser heredado por las nuevas células todas las veces en que la bacteria se multiplique (Sociedad Mexicana de Ciencias Genómicas, 2002).

En este proyecto, se transformaron las bacterias competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) mediante choque térmico, con el plásmido comercial pET-21b Pfluor-Betalac que contiene el gen que codifica para la betalactamasa de *P. fluorescens*. Este método de transformación consiste en un aumento y disminución de la

temperatura, que ocasiona la restauración de la permeabilidad membranal, una vez se le adiciona la cantidad suficiente del plásmido. Al establecer las células en condiciones óptimas de crecimiento, se obtienen las células transformantes.

Se tomaron 100µL de las células competentes en hielo, y se le adicionó 100ng (2µL) del plásmido pET-21b Pfluor-Betalac. Posteriormente, se incubó por 20 minutos en hielo para facilitar la inserción del vector sobre las bacterias. El medio se expuso a 42°C por 30 segundos, facilitando el cierre de los poros de la membrana celular bacteriana. Finalmente, se añadió 150µL de Caldo LB y se incubó por 1 hora a 37°C con agitación.

Se evaluaron 3 controles de selección con diferentes placas de cultivo y condiciones. Se realizó un control positivo en un medio con Agar LB sólido de bacterias no transformantes, para evidenciar viabilidad de los cultivos empleados. Posteriormente, se evaluó un control negativo a partir de un medio suplementado con ampicilina, descartando la presencia de colonias de *E. coli* sin transformar. Finalmente, se analizó el control por bacterias competentes en un medio suplementado con el mismo antibiótico, esperando encontrar bacterias transformadas que tenían resistencia al fármaco, debido a la región del plásmido que le confería esta característica.

2.4.2. Pruebas de expresión y solubilidad de la enzima recombinante por inducción a diferentes concentraciones de IPTG y temperaturas de crecimiento.

Para realizar estudios de actividad enzimática, es indispensable contar con la cantidad de enzima activa suficiente. Esta es, principalmente, obtenida de la fracción soluble, ya que está correctamente estructurada o plegada. Un método para inducir la expresión de las proteínas recombinantes es mediante el uso de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido), un análogo químico de la galactosa que no puede ser hidrolizado por la enzima β-galactosidasa, por lo que induce la actividad del operón *lac* de *E. coli* uniéndose e inhibiendo el represor *lac* sin degradarse (BIOLINE, 2007).

Se estudiaron cuatro concentraciones del inductor de expresión: 0.2mM, 0.6mM, 0.8mM Y 1.0Mm, y estos medios inducidos fueron expuestos a temperaturas de crecimiento de 37°C, 18°C y temperatura ambiente (~27°C), hasta 7 horas posteriores a la inducción con IPTG (0, 4 y 18 horas para 18°C).

Tabla 2. Concentraciones de IPTG y temperaturas a evaluar.

Concentración de IPTG (mM)	Temperatura de crecimiento (°C)	Tiempo posterior a la inducción (horas)
0,2	37	0 – 7
0,6	T. ambiente (27°C)	
0,8	18	0, 4, 18

1,0		
-----	--	--

Inicialmente, se preparó un inóculo de 2mL de agar LB líquido suplementado con ampicilina (a una concentración de 100µg/mL), con 2µL del cultivo de *E. coli* BL21(DE3) previamente transformado con el plásmido de interés, dejando incubar a 37°C con agitación constante durante 15 horas. Posteriormente, se realizó un subcultivo con una dilución 1:100 inóculo *E. coli* transformantes:Caldo LB suplementado con ampicilina (100µg/µL), respectivamente. De igual forma, se dejó incubar a 37°C con agitación constante hasta obtener un OD₆₀₀ entre 0,5-1,0.

Una vez que preparado el cultivo, se realizaron 4 alícuotas de 8mL, donde se le adicionó a cada una la cantidad de IPTG suficiente para estar a las concentraciones de estudio, a partir de una solución stock 400mM.

Tabla 3. Volúmenes de IPTG adicionados a partir de la solución madre.

Concentración de IPTG (mM)	Volumen de IPTG adicionado (µL)
0,2	4
0,6	12
0,8	16
1,0	20

Por cada hora posterior a la inducción, se tomaron dos alícuota de 500µL en tubos eppendorf para cada concentración diferente, hasta la séptima hora, donde se centrifugaron a 15000RPM por 15 minutos, eliminando el sobrenadante y guardando el pellet a temperaturas de -20°C.

2.4.2.1. Pruebas de expresión de los medios inducidos con IPTG.

Fue indispensable evaluar si la condición experimental estudiada permitió que la enzima recombinante se expresara, identificando la banda correspondiente a la betalactamasa mediante electroforesis SDS-PAGE, a partir de su peso molecular (39.7KDa). La preparación de estos geles se encuentra en la sección de Anexos.

Los pellets previamente almacenados a temperatura de -20°C, se resuspendieron en buffer de carga SDS-PAGE 1X (0.5M Tris-HCl, pH 6,8, Glicerol (100%), β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, SDS). Posteriormente, se desnaturalizaron las proteínas, exponiendo las muestras a 90°C por 5 minutos y centrifugando a 15000RPM por 10 minutos, cargándolas en los pozos del gel de poliacrilamida. Durante la corrida, se aplicó un voltaje de 80V por 20 minutos. Posteriormente, se aumentó a 110V hasta que recorriese todo el gel.

La revelación de los geles se realizó mediante la adición de los reactivos A (0.5g azul de Coomassie, 250mL isopropanol, 100mL ácido acético, 650mL agua desionizada), B (0.05g azul de Coomassie, 100mL isopropanol, 100mL ácido

acético, 800mL agua desionizada), C (0.02g azul de Coomassie, 100mL ácido acético, 900mL agua desionizada) y D (100mL ácido acético, 900mL agua desionizada), calentando los geles por 2 minutos, con la adición de cada uno de ellos. El tratamiento final consistió en la adición de una solución de ácido acético diluido, que permitía desteñir el gel para observar mejor las bandas correspondientes a las proteínas separadas.

2.4.2.2. Pruebas de solubilidad de los medios inducidos con IPTG

La solubilidad es un factor importante que se tuvo en cuenta para determinar las condiciones óptimas a las que se obtuvo la enzima en forma activa. Esto permitió establecer diferencias entre las concentraciones de IPTG, las temperaturas y el tiempo posterior a la inducción a la cual la enzima se encontraba mayoritariamente en su fracción soluble. Para llevar a cabo el análisis anterior, fue indispensable llevar a cabo el protocolo BugBuster, el cual está formulado para romper la pared celular de bacterias *E. coli* de manera suave, sin afectación de las proteínas que en ellas se encuentre y liberándolas de forma soluble. (Novagen, 2000).

Los otros pellets almacenados fueron empleados para evaluar solubilidad, acorde a la temperatura y concentración de IPTG inducidos. Sin embargo, se eligió el tiempo inicial (2h), intermedio (4h) y final (7h) de inducción, para las temperaturas de 27°C y 37°C, mientras que, para 18°C, t=4 y t=18. Las muestras se resuspendieron en 100µL del reactivo BugBuster, adicionando 1µL de benzonasa (25 unidades de benzonasa en Tris-HCl) y manteniendo en agitación constante por 20-30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 15000RPM por 10 minutos, separando el sobrenadante (correspondiente a la fracción soluble) del pellet (fracción insoluble, formación de cuerpos de inclusión).

Los tubos que contenían la fracción soluble se mezclaron con buffer de carga 2X, realizando una dilución para obtener enzima-Buffer de carga 1X. Finalmente, éstos se calentaron a 90°C por 5 minutos, y se centrifugaron a 15000RPM por 10 minutos, cargándolos en los geles de electroforesis. Por otro lado, los tubos que contenían la fracción insoluble se resuspendieron en 100µL de buffer de carga 1X, calentando y centrifugando de igual forma.

2.4.3. Purificación de la betalactamasa recombinante por cromatografía de afinidad con resina de níquel

La purificación de una enzima es esencial en procesos de investigación que involucran ensayos de actividad enzimática. Esto asegura un estudio de cinética enzimática más confiable, pues se tiene certeza de la proveniencia de los productos obtenidos en las reacciones de sustratos añadidos por una enzima en particular. En este trabajo, para la purificación de la enzima recombinante, se

aprovechó una secuencia de 6 histidinas (en forma de cola), introducida a nivel genético para su purificación, mediante cromatografía de afinidad.

2.4.3.1. Extracción de la betalactamasa en su fracción soluble del cultivo con bacterias *E. coli* transformadas.

Se realizó un medio de cultivo de 250mL suplementado con ampicilina, con bacterias transformadas de *E. coli* BL21(DE3), induciendo la expresión del plásmido a 0.2mM, temperatura ambiente, y deteniendo la misma una vez haya transcurrido 4 horas. Seguidamente, se realizó una alícuota de la muestra de 20 μ L en un tubo eppendorf, como muestra para análisis por electroforesis SDS-PAGE. En tubos Falcon, se centrifugó el cultivo a 4000RPM y 4°C, por 30 minutos. Finalmente, se desechó el sobrenadante y se almacenaron los pellets a una temperatura de -80°C.

Estos pellets se resuspendieron en buffer de lisis (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol, pH 8.0), adicionando 5mL por cada gramo de células obtenida. Se agregó una solución PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 100mg/mL en acetona, para inhibir las proteasas presentes en la muestra. Posteriormente, se añadió lisozima 100mg/mL y se incubó en hielo por 30 minutos. Dicha muestra se sometió a ultrasonido por 5 ciclos (125W, 1 minuto por pulso y 2 minutos de descanso, amplitud de 40%) utilizando el sonicador QSonica. El lisado celular se centrifugó a 4000RPM por 30 minutos, y se guardó el sobrenadante, correspondiente a la fracción soluble o enzima activa. Seguidamente, se adicionó Sulfato de estreptomycin a una cantidad final de 2% P/V del volumen total de lisado, con el fin de eliminar ADN y ARN del extracto celular. Para esto, se dividió en cuartos la cantidad de la sal a adicionar, y se añadió cada cuarto a intervalos de 5 minutos, dejando agitar en frío por 15 minutos. Finalmente, se centrifugó a 4000rpm y 4°C por 30 minutos, conservando el sobrenadante. En esta etapa, se tomó una alícuota de 20 μ L para el análisis electroforético.

2.4.3.2. Separación de la enzima de interés mediante cromatografía de afinidad con resina de níquel

Es importante destacar que el plásmido que contiene el gen que codifica para la betalactamasa de *P. fluorescens*, está modificado para expresar una secuencia de 6 histidinas en la parte exterior, cumpliendo la función de que la enzima se una con bastante afinidad a un soporte que contiene níquel, y que el método de purificación sea más efectivo.

Se empleó una columna cromatográfica de Sigma Aldrich de 10cm de longitud, a la cual se le adicionó 1.5mL de la resina Níquel-NTA GenScript; realizando una previa calibración con buffer de lisis. La muestra con la enzima se adicionó en la misma columna, agitando constantemente la mezcla durante 30 minutos, con el fin de que las colas de histidina de la enzima se unan al níquel. Se dejó pasar la mezcla por la columna, colectando la fracción correspondiente al Flow through o

punto de equilibrio. Posteriormente, para la purificación correspondiente, se empleó buffer de lavado por duplicado (50mM NaH₂PO₄, 1M NaCl, 20mM imidazol, pH 8.0), adicionando 4mL por cada uno, y colectando las fracciones que pasaban por la columna. Finalmente, se adicionó buffer de elución por cuatro veces (50mM NaH₂PO₄, 1M NaCl, 250mM imidazol, pH 8.0), colectando las fracciones que salen por la columna, correspondientes a la enzima de interés que se separó de la resina. Se tomó una alícuota para cada fracción colectada anteriormente, las cuales se analizaron por electroforesis SDS-PAGE

2.4.4. Diálisis de la betalactamasa para la eliminación de sales y otras moléculas

La diálisis de la enzima de interés purificada, se realizó utilizando un dispositivo de filtro centrífugo Amicon® Ultra-15 10K, con el objetivo de filtrar, separar y dejar pasar al tubo las moléculas cuyo peso molecular eran menores a 10000kDa, dejando el concentrado enzimático en el depósito del dispositivo (Merck Millipore Corporation Ltd. Billerica, MA, U.S.A., 2014), con el objetivo de disminuir la concentración de imidazol adquirido por el buffer de elución añadido.

Para lo anterior, se adicionó las eluciones que contenían la enzima de interés al dispositivo de filtro centrífugo, diluyendo la muestra en buffer Tris 20mM y NaCl 100mM a pH 6.7, hasta completar un volumen total de 10mL. Posteriormente, se centrifugó a 5000RPM por 20 minutos, hasta obtener en el depósito 500µL del concentrado. Este procedimiento se realizó por triplicado calculando, finalmente, la concentración teórica final de imidazol en la solución.

2.4.5. Cuantificación de la betalactamasa mediante el método de Bradford

La cuantificación de proteínas presentes en una solución permite seguir la purificación de una en particular, y determinar el éxito su estrategia. Para determinar la concentración de betalactamasa mediante Bradford, se preparó una solución madre de Albúmina de Suero Bovino (BSA) a 10µg/µL en buffer fosfato 5mM a pH 7.0. A partir de la solución madre, se llevaron a cabo distintas disoluciones mostradas en la Tabla 3.

Tabla 4. Disoluciones para la construcción de la curva de calibración de BSA

Volumen solución madre (µL)	Volumen Reactivo de Bradford (mL)
1	1
2	1
3	1
4	1
5	1

6	1
---	---

A partir de lo anterior, se midieron absorbancias a 595nm, utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis. Con estos datos y la cantidad de proteína usada en cada ensayo, se construyó la curva de calibración para obtener la ecuación correspondiente, donde se determinó la concentración de betalactamasa de la muestra purificada previamente, usando el método de Bradford. Para ello, se tomó 3µL del concentrado enzimático, previamente diluido a una proporción 1:10 con buffer Tris pH 6.7. Al mismo se le adicionó 1mL del reactivo de Bradford. En seguida, se incubó la muestra por 10 minutos en la oscuridad y, finalmente, se determinó absorbancias a 595nm para cada muestra, tomando como blanco la solución sin proteína.

2.4.6. Ensayo cuantitativo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante con nitrocefina como sustrato.

Se llevó a cabo diferentes ensayos cinéticos, con el objetivo de determinar experimentalmente si la betalactamasa recombinante, previamente purificada, estaba activa enzimáticamente, a partir de la hidrólisis con un sustrato característicos de poseer un anillo lactámico.

El concentrado enzimático que se obtuvo en el literal 2.4.4., se separó en 4 alícuotas de 100µL, con el objetivo de almacenar parte de la muestra a diferentes temperaturas; dos de estas a 4°C, mientras las restantes a -80°C. De acuerdo con lo anterior, se determinaron absorbancias del producto de nitrocefina hidrolizado por la betalactamasa, a diferentes concentraciones del sustrato, y a tiempos promedio de 12 minutos, para determinar las velocidades iniciales en cada concentración.

La solución de ensayo para cada concentración de sustrato a evaluar contenía las composiciones ilustradas en la Tabla 4, cuyo volumen total fue de 100µL. Para cada una, se prepararon diferentes soluciones madre, adicionando una cantidad determinada acorde a la concentración deseada. Para cada ensayo, se midieron absorbancias a una longitud de onda de 486nm.

Tabla 5. Composición de las soluciones de ensayo para cada concentración de nitrocefina.

Ensayo	Concentración Nitrocefina	Vol. Buffer fosfato (200Mm, pH 7.0)	Vol. Sulfato de Zinc [10mM]	Vol. Nitrocefina [1,94mM]	Cantidad enzima [8,76nM]	Agua MilliQ
1	2mM	10µL	10µL	103,3µL	5µL	0
2	1mM	10µL	10µL	51,65µL	5µL	23,35µL
3	600µM	10µL	10µL	31µL	5µL	44,01µL
4	500µM	10µL	10µL	25,83µL	5µL	49,17µL
5	400µM	10µL	10µL	20,66µL	5µL	54,34µL

6	300 μ M	10 μ L	10 μ L	15,5 μ L	5 μ L	59,5 μ L
7	250 μ M	10 μ L	10 μ L	12,91 μ L	5 μ L	62,08 μ L
8	175 μ M	10 μ L	10 μ L	9,04 μ L	5 μ L	65,96 μ L
9	125 μ M	10 μ L	10 μ L	6,46 μ L	5 μ L	68,54 μ L
10	100 μ M	10 μ L	10 μ L	5,17 μ L	5 μ L	69,83 μ L
11	63 μ M	10 μ L	10 μ L	3,25 μ L	5 μ L	71,74 μ L

2.4.7. Cálculo de parámetros cinéticos con los resultados experimentales de actividad enzimática para la betalactamasa recombinante.

A partir de las absorbancias registradas para cada concentración de sustrato, se graficaron estos resultados contra el tiempo transcurrido, para cada concentración de nitrocefina. Estos permitieron determinar la velocidad inicial, correspondiente para cada concentración. De manera similar, se realizó otra gráfica de concentración de sustrato (nitrocefina) versus velocidad inicial de reacción enzimática, cuyos resultados se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 7, el cual permitió una aproximación mediante mínimos cuadrados, obteniendo los parámetros de K_M y V_{max} ; calculando, posteriormente, el número de recambio (K_{cat}) y la constante de especificidad (K_{cat}/K_M).

La matriz de marco lógico para la realización del proyecto de grado se muestra a continuación, en la Tabla 5.

Tabla 6. Matriz de marco lógico para la realización del proyecto de grado.

OBJETIVO GENERAL			
Determinar los parámetros cinéticos de la betalactamasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> producida de forma recombinante en <i>E. coli</i> , a partir de las constantes cinéticas de velocidad máxima de reacción enzimática (V_{max}) y constante de Michaelis-Menten (K_M).			
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	ACTIVIDADES	SUPUESTOS	INDICADORES
Determinar las condiciones óptimas de expresión y solubilidad de la betalactamasa recombinante de <i>P. fluorescens</i> .	Transformar los cultivos competentes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3). Inducir la expresión del gen, a diferentes concentraciones de IPTG y	Disponibilidad del plásmido comercial en condiciones óptimas para ser transformado en cultivos de <i>E. coli</i> BL21 (DE3). Presencia de la betalactamasa en	Bandas en geles de electroforesis SDS-PAGE con la mayor cantidad de enzima expresada identificadas. Bandas en geles de electroforesis

	<p>temperatura.</p> <p>Analizar la expresión a diferentes horas de inducción, por electroforesis SDS-PAGE.</p> <p>Analizar las solubilidades de los cultivos transformados de <i>E. coli</i> BL21 (DE3), mediante electroforesis SDS-PAGE.</p>	<p>los cultivos de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) previamente transformados.</p> <p>Presencia de bandas en geles de electroforesis SDS-PAGE con la expresión de la betalactamasa en su fracción soluble, de los cultivos inducidos con IPTG a una temperatura determinada.</p>	<p>SDS-PAGE con la mayor cantidad de enzima expresada en su fracción soluble identificadas.</p>
<p>Separar y purificar la enzima betalactamasa de <i>P. fluorescens</i> usando la técnica de cromatografía de afinidad con resina de níquel.</p>	<p>Cultivar las bacterias transformadas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3), bajo las condiciones óptimas de expresión y solubilidad.</p> <p>Separar las proteínas en la mezcla por la columna cromatográfica, utilizando una resina de níquel.</p> <p>Analizar por electroforesis SDS-PAGE las fracciones obtenidas en cada elución.</p>	<p>Disponibilidad de la betalactamasa en el lisado celular de extracción, con las condiciones óptimas previamente establecidas.</p> <p>Disponibilidad del sonicador QSonica para llevar a cabo el lisado celular por ultrasonido.</p> <p>Disponibilidad de la columna cromatográfica de Sigma-Aldrich</p>	<p>Fracciones en las eluciones de la columna cromatográfica de Sigma-Aldrich obtenidas</p> <p>Banda en gel de electroforesis SDS-PAGE con la elución que contiene la mayor cantidad de enzima pura identificada.</p>

<p>Evaluar la actividad enzimática de la betalactamasa de <i>P. fluorescens</i> recombinante, utilizando como sustrato cromogénico Nitrocefina.</p>	<p>Realizar ensayos cuantitativos de actividad enzimática con Nitrocefina.</p> <p>Determinar absorbancias del sustrato hidrolizado, en presencia de la enzima.</p> <p>Calcular los parámetros cinéticos de K_M, V_{max} Y K_{cat}.</p>	<p>Disponer del reactivo de Nitrocefina para llevar a cabo las pruebas de actividad.</p> <p>Disponibilidad de un espectrofotómetro calibrado, para mediciones de absorbancias.</p>	<p>Ensayos cuantitativos de actividad enzimática con Nitrocefina realizados.</p> <p>Gráfica de Michaelis-Menten con las diferentes concentraciones de sustrato obtenida.</p>
---	---	--	--

2.5. Resultados

2.5.1. Transformación de los cultivos de *Escherichia coli* BL21(DE3).

Se emplearon bacterias de *Escherichia coli* BL21(DE3), que se encontraban almacenadas a temperatura de -80°C. Mediante tratamientos con cloruro de calcio 0.1M, se logró obtener los cultivos competentes, que se conservaron a la misma temperatura, con el objetivo de mantener su viabilidad para el proceso de transformación bacteriana. El choque térmico a 42°C permitió la inserción del plásmido identificado con la etiqueta Pet-21b Pfluor-Betalac.

La evidencia del éxito en el método de transformación se pudo observar a través de controles de selección. En el control positivo (Placa de Agar LB) se pudo observar colonias de bacterias no transformantes y otros contaminantes que crecían bajo los nutrientes proporcionados en la placa. Respecto al control negativo (placa de Agar LB suplementada con ampicilina), no mostró crecimiento de bacterias *E. coli* sin transformar; y, finalmente, el control por bacterias competentes permitió evidenciar presencia de colonias correspondientes a bacterias transformadas (Tabla 7).

Tabla 7. Observaciones de los controles de selección para el método de transformación empleado

Control	Composición	Resultado
Positivo	Agar LB sin ampicilina	Presencia de colonias de <i>E. coli</i> no transformantes
Negativo	Agar LB con ampicilina	Ausencia de colonias en toda la placa
Bacterias competentes	Agar LB con ampicilina	Presencia de colonias <i>E. coli</i> transformadas

2.5.2. Pruebas de expresión de los medios inducidos con IPTG

Las pruebas de expresión, induciendo las bacterias transformantes con IPTG, fue un factor clave para la determinación de las condiciones óptimas de obtención de la enzima en forma activa. A diferentes concentraciones de IPTG y temperaturas de crecimiento (Tabla 1), se observó en los geles de electroforesis SDS-PAGE realizados, la banda intensa correspondiente a la betalactamasa recombinante (identificada por su peso molecular de 39.7kDa) por cada hora posterior a la

inducción. En cada una de las condiciones experimentales evaluadas, se puede observar una tendencia ascendente con la cantidad de enzima expresada, que se identificó a partir de su peso molecular. Sin embargo, este parámetro se ve excluido en los ensayos a temperatura de 18°C.

Para cada gel de electroforesis realizado, se evidencia: El marcador de peso molecular BIO-RAD; un control negativo, correspondiente a cultivos *E. coli* sin transformar, para identificar la expresión de proteínas nativas de la bacteria y comparar con la de la enzima de interés; una muestra antes de la inducción con IPTG y las muestras correspondientes a cada hora posterior a este paso.

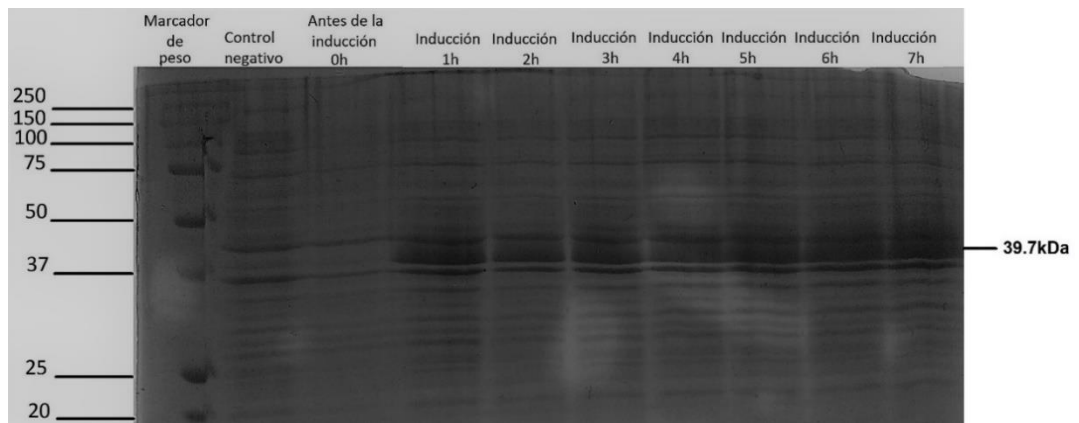


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. 37° - IPTG 0,2mM.

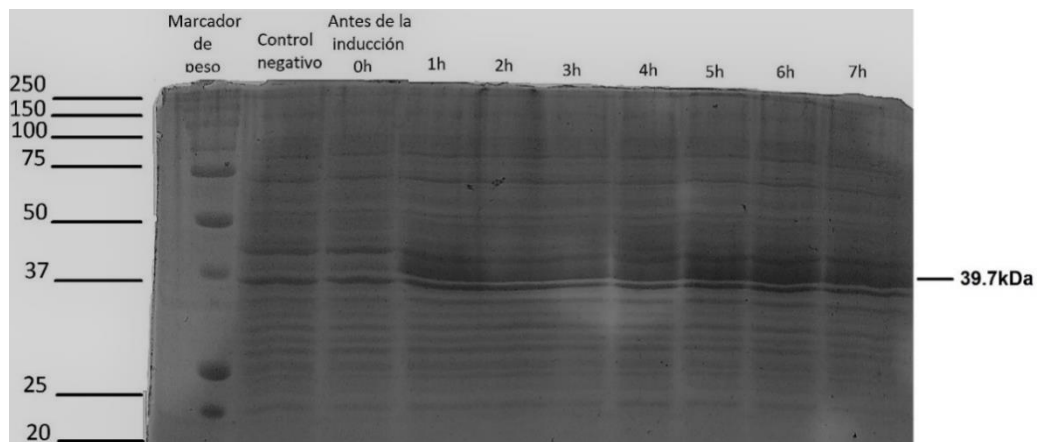


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. 37° - IPTG 0,6mM.

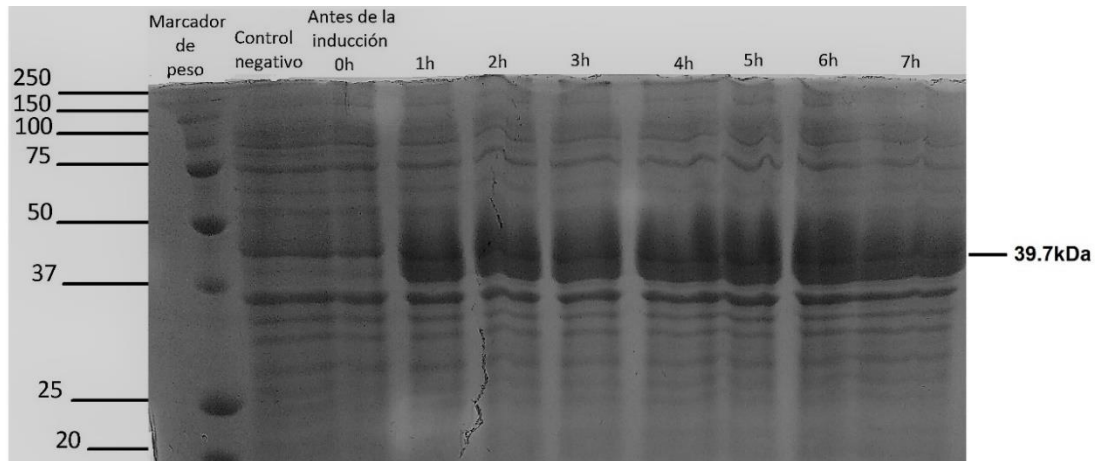


Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. 37° - IPTG 0,8mM.

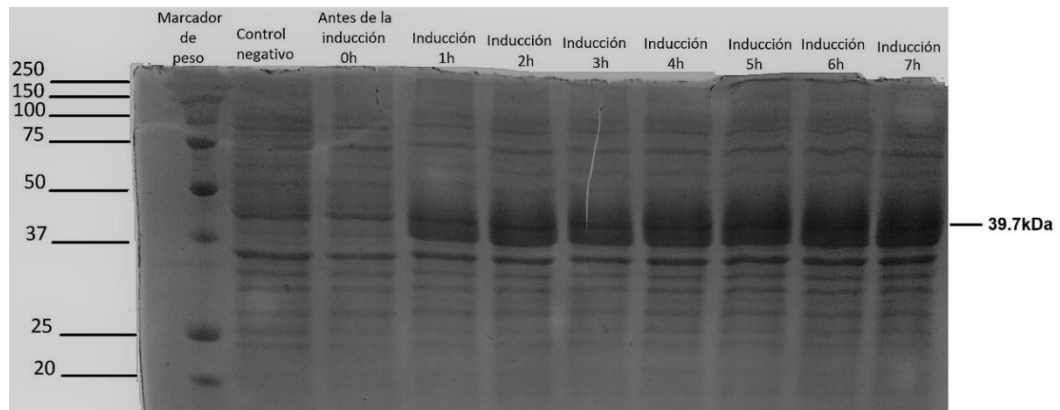


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. 37° - IPTG 1.0mM.

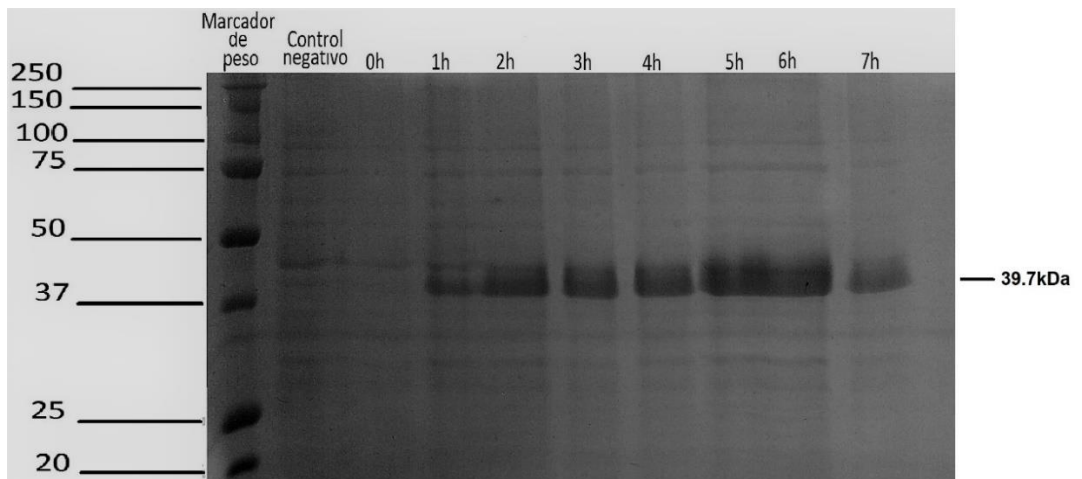


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. ambiente (27°C) - IPTG 0.2mM.

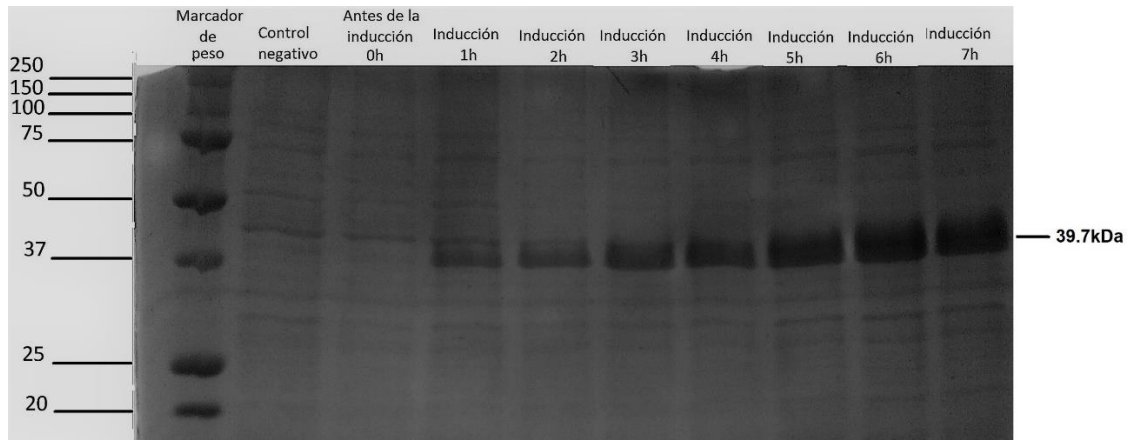


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. ambiente (27°C) - IPTG 0.6mM.

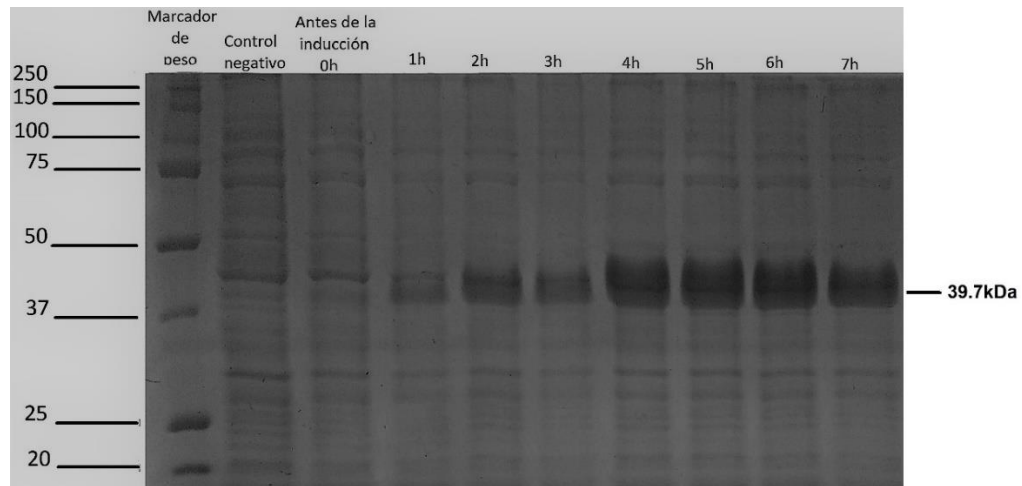


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. ambiente (27°C) - IPTG 0.8mM.

De acuerdo con cada una de las pruebas realizadas, se puede determinar que la condición experimental con la mayor cantidad de enzima expresada (independiente de la solubilidad), fue la ilustrada en la Figura 12, a 7 horas posteriores a la inducción. Sin embargo, esta evidencia no demuestra la cantidad óptima de enzima que puede obtenerse de forma activa.

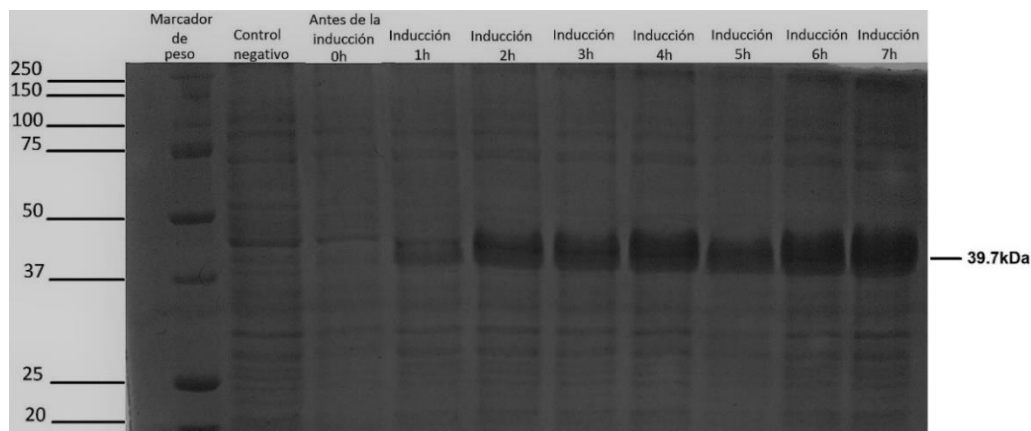


Figura 12. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. ambiente - IPTG 1.0mM.

Para la condición evaluada a temperatura de 18°C, se optó por valorar horas post-inducción más prolongadas, debido a la disminución en la velocidad de reproducibilidad entre las bacterias transformadas; lo anterior no determinaría diferencias significativas por cada hora observada, por lo que se definió tiempos de 4 y 18 horas. Los resultados evidencian que no existe una tendencia ascendente con la cantidad de enzima expresada. Además, ésta disminuye conforme aumenta el tiempo de inducción, debido a que se presencia una intensidad de banda en 39.7kDa mayor para las 4 horas que para las 18 horas.

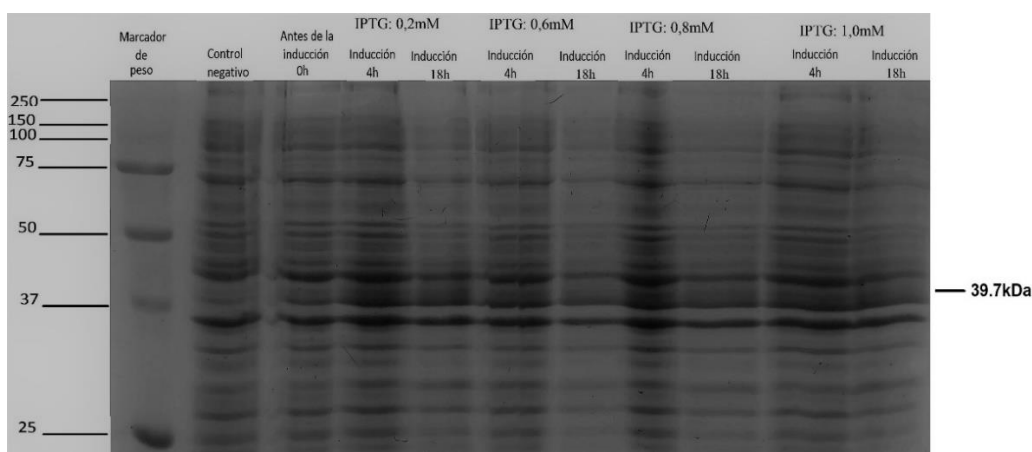


Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de expresión. Temp. 18°C - IPTG 0.2, 0.6, 0.8, 1.0mM.

A partir de lo anterior, se realizó pruebas de solubilidad a cada condición medida.

2.5.2.1. Pruebas de solubilidad de los medios inducidos con IPTG.

Para comparar cualitativamente la cantidad de enzima soluble (o activa), de la que se obtiene insoluble por la formación de cuerpos de inclusión, se empleó el protocolo BugBuster, evaluando a tiempos de inducción iniciales, intermedios y

finales, para optimizar el trabajo realizado y prevenir el uso excesivo de los reactivos correspondientes. Por lo tanto, se empleó alícuotas de las horas 2, 4 y 7.

Los geles de electroforesis evidencian: El marcador de peso molecular BIO-RAD, la fracción insoluble y la fracción soluble para las horas 2, 4 y 7. Las muestras realizadas a 37°C, mostraron una variación en la cantidad de enzima soluble-insoluble de 50:50 (intensidad de bandas similares). Esto demuestra que el tiempo post-inducción no interfiere con la solubilidad de la enzima a 37°C.

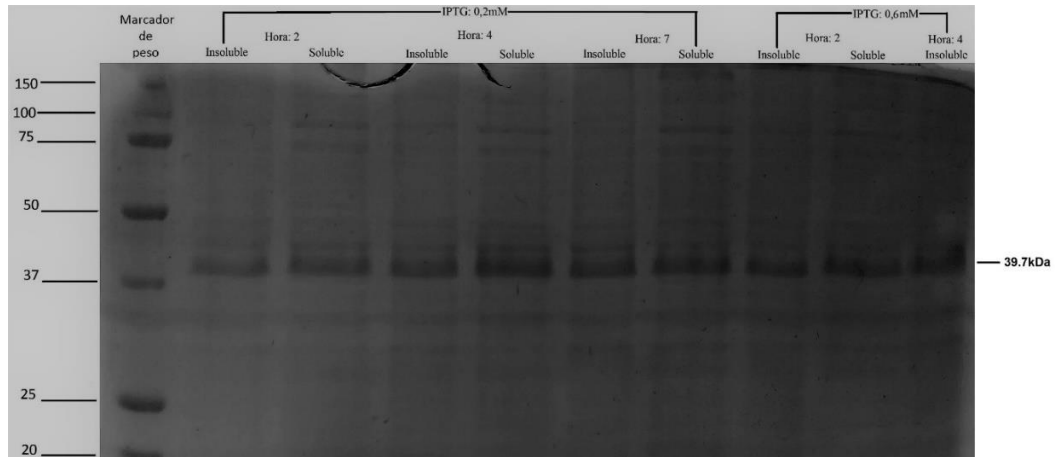


Figura 14. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. 37°C - IPTG 0.2, 0.6mM.

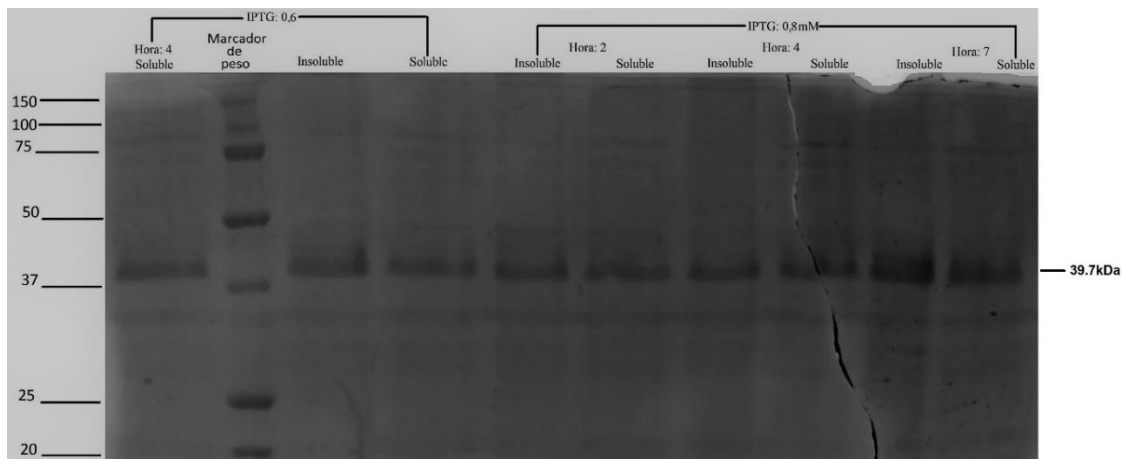


Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. 37°C - IPTG 0.6, 0.8mM.

Los análisis por electroforesis SDS-PAGE para la concentración de IPTG 1.0mM no se lograron realizar correctamente, debido a errores experimentales en la preparación del gel y la condición de las muestras. En la Figura 16, se observan bandas débiles que no corresponden a las verdaderas cantidades de enzima que deberían obtenerse para cada hora de inducción.

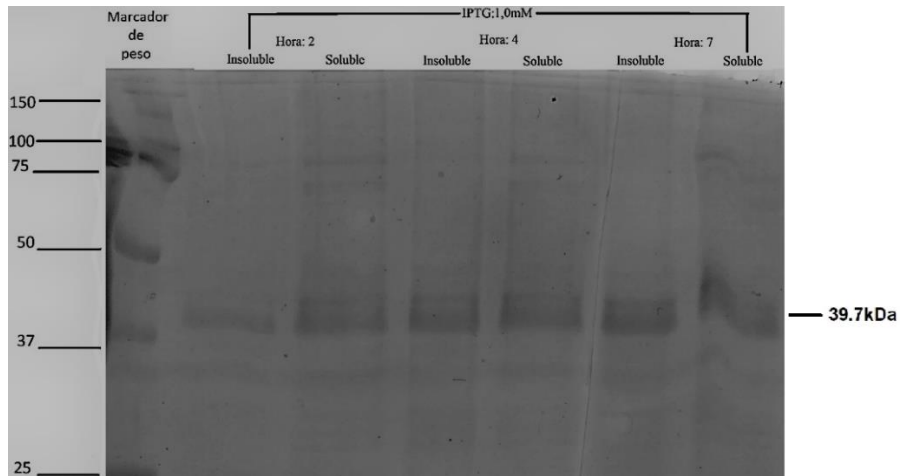


Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. 37°C - IPTG 1.0mM.

Las pruebas a temperatura ambiente (27°C) presentan diferencias significativas de solubilidad, debido a la presencia de bandas con intensidades mayores en fracciones solubles, que en fracciones insolubles. Esto indica que, a temperaturas bajas, se reduce el estrés metabólico que produce la formación de los cuerpos de inclusión en la enzima recombinante.

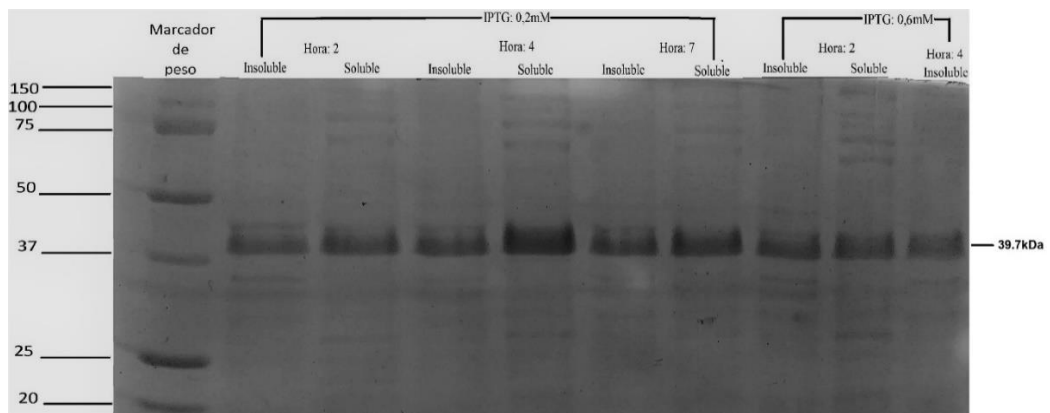


Figura 17. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. ambiente - IPTG 0.2, 0.6mM.

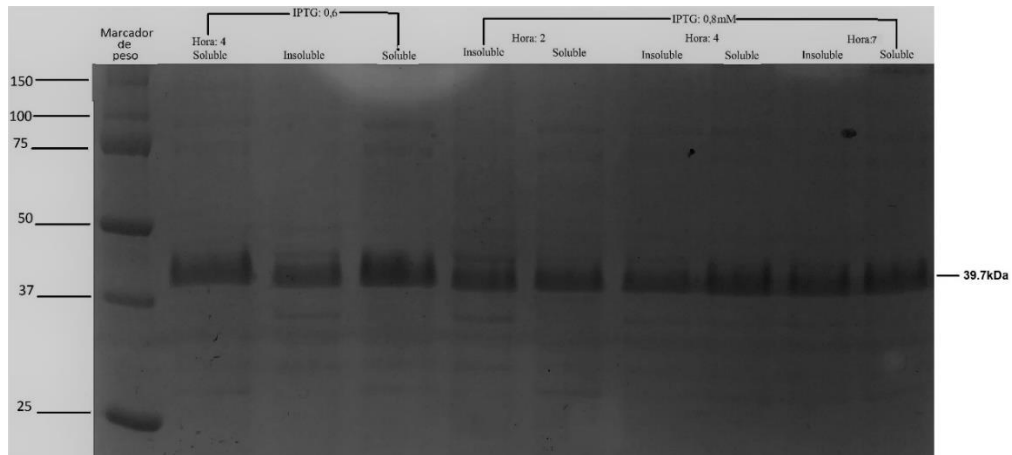


Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. ambiente - IPTG 0.6, 0.8mM.

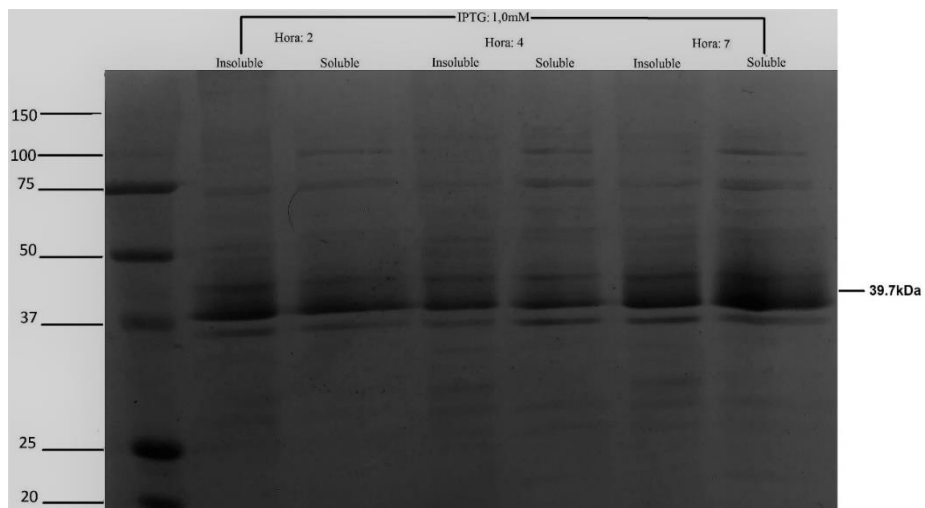


Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. ambiente - IPTG 1.0mM.

Finalmente, las pruebas de solubilidad de los cultivos inducidos a 18°C no mostraron cantidades significativas de enzima en fracción soluble, debido a la baja expresión de esta en dichas condiciones.

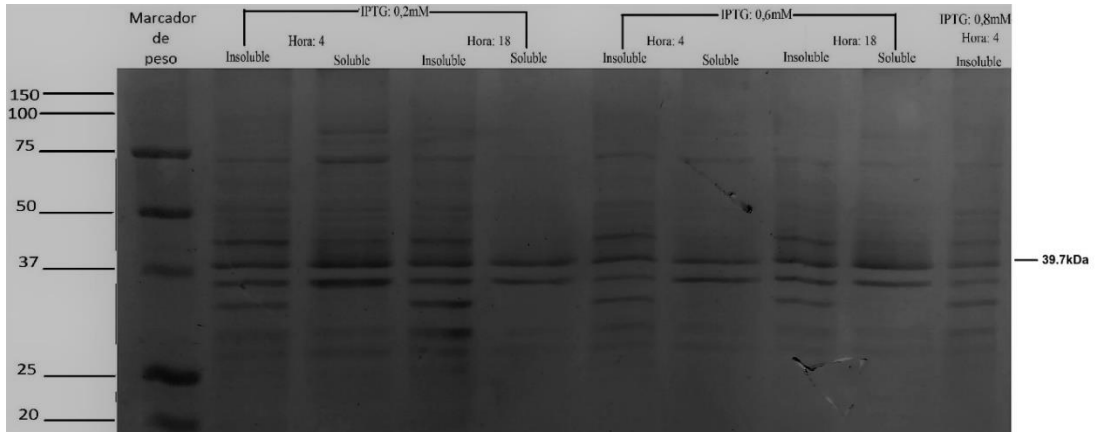


Figura 20. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. 18°C - IPTG 0.2, 0.6, 0.8mM.

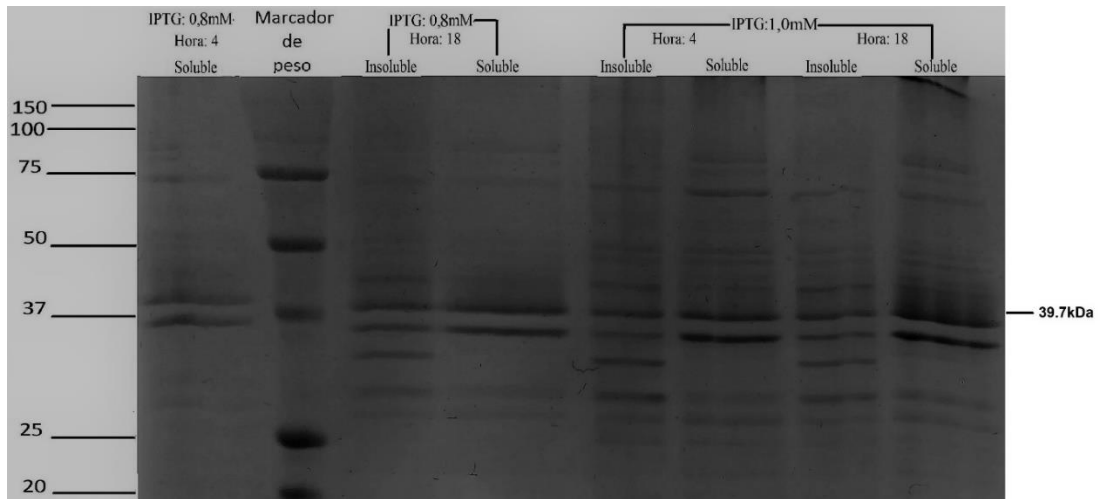


Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE en pruebas de solubilidad. Temp. 18°C - IPTG 0.8, 1.0mM.

De acuerdo con los resultados de solubilidad, las condiciones con la cantidad de enzima en fracción soluble significativas fueron, a temperatura ambiente: concentración IPTG 0.2mM y 4 horas post-inducción; concentración IPTG 0.6mM, 4 y 7 horas post-inducción; y concentración IPTG 1.0 y luego de 7 horas.

Finalmente, debido al mayor rendimiento, al igual que el impacto que genera el uso del IPTG, se optó por elegir la concentración de 0.2Mm (menor), temperatura ambiente y 4 horas posteriores de crecimiento, como los parámetros óptimos de expresión y solubilidad de la enzima recombinante (Figura 17).

2.5.3. Purificación de la betalactamasa recombinante por cromatografía de afinidad con resina de níquel

Se preparó un cultivo de 250mL con las bacterias recombinantes que contenían el plásmido de interés. Dicha muestra se dejó crecer hasta un OD₆₀₀ de 0.58, y se

indujo la expresión del gen con las condiciones previamente establecidas como óptimas. En el método de purificación de la enzima por cromatografía de afinidad con resina de níquel, se tomaron diferentes alícuotas para evaluar el éxito de la purificación: 1. Fracción insoluble del medio a 4 horas posteriores a la inducción, 2. Fracción soluble del medio a 4 horas posteriores a la inducción, 3. Expresión de la enzima de interés, 4 horas después de que el medio fue inducido a IPTG 0.2mM y temperatura ambiente, 4. Expresión de la betalactamasa, una vez adicionado el sulfato de estreptomicina para la eliminación de ADN y ARN del extracto celular, 5. El “Flow through” o paso de equilibrio, por el que salen las proteínas que no se unen a la resina, 6. Las 2 fracciones correspondientes con la adición de buffer de lavado y 7. Las fracciones con las eluciones para la obtención de la enzima que estaba unida a la resina de níquel.

Por otro lado, acorde a la Figura 22, se realizó una cuantificación por densitometría, con el objetivo de comparar la densidad de las bandas correspondientes a la betalactamasa recombinante, respecto a las del mismo pozo, pudiendo determinar una proporción entre la intensidad de las bandas y lograr una comparación cuantitativa más confiable.

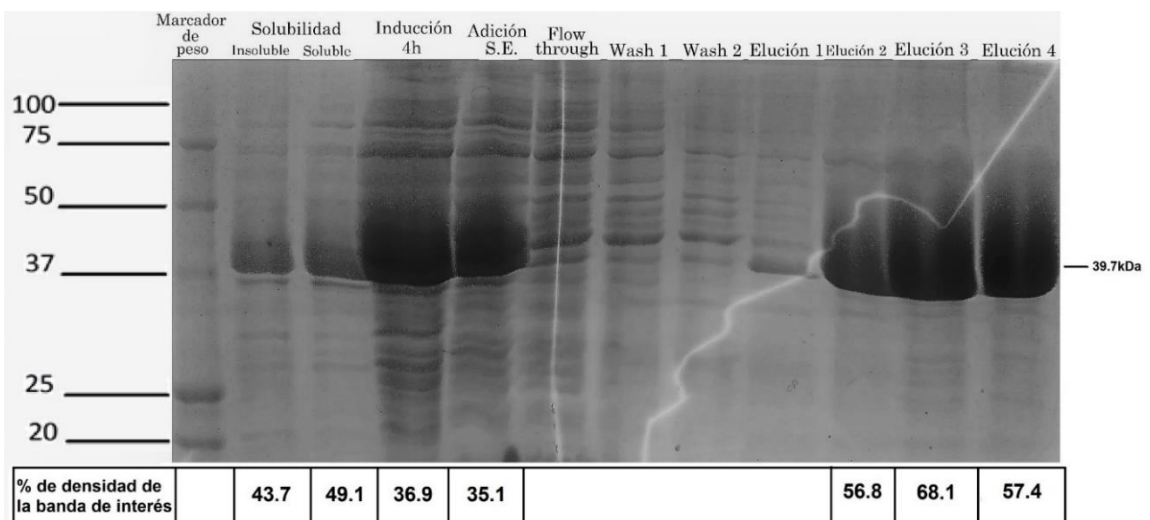


Figura 22. Electroforesis SDS-PAGE con los pasos de purificación de la enzima recombinante por cromatografía de afinidad, a un cultivo de 250mL de *E. coli*.

De acuerdo con las observaciones, la solubilidad del medio de cultivo preparado estuvo a una proporción casi equivalente, aunque con una tendencia de mayor cantidad en la fracción soluble, un indicativo favorable para la continuación del análisis. Por otro lado, la adición del sulfato de estreptomicina no interfirió significativamente con el rendimiento de la enzima, pues no se observan pérdidas considerables de la misma. Además, el “Flow through” permitió el paso de las proteínas no deseadas, sin pérdidas considerables de betalactamasa, lo que se evidencia de igual forma en los dos lavados correspondientes. Esto indicó que la enzima se unía eficientemente a la resina de níquel, debido a la cola de histidinas en esta. Finalmente, para las eluciones correspondientes, se puede observar que

la mayoría de esta enzima se encontraba en las tres últimas eluciones, especialmente en la tercera de ellas, con un rendimiento de purificación aproximado de 90%, teniendo en cuenta la intensidad de las otras bandas presentes en estas últimas.

2.5.4. Diálisis de la betalactamasa para la eliminación de sales y otras moléculas.

De acuerdo con la purificación anterior, las fracciones que contenían las 3 últimas eluciones se mezclaron, obteniendo un volumen del concentrado enzimático total de 3mL. A partir de esta mezcla, se realizó la diálisis empleando el dispositivo de filtro centrífugo Amicon® Ultra-15 10K. Con base en lo anterior, se realizaron 3 centrifugados, los cuales se detenían cuando el volumen del concentrado fuese de 500µL.

Tabla 8. Dilución de la concentración de imidazol en la diálisis de la betalactamasa obtenida en el proceso de purificación.

Dilución 1	$C_1 = 250\text{mM}$ $V_1 = 3\text{mL}$ $C_2 = ?$ $V_2 = 10\text{mL}$	$C_2 = \frac{250\text{mM} \times 3\text{mL}}{10\text{mL}}$ $C_2 = 75\text{mM}$
Dilución 2	$C_1 = 75\text{mM}$ $V_1 = 0,5\text{mL}$ $C_2 = ?$ $V_2 = 10\text{mL}$	$C_2 = \frac{75\text{mM} \times 0,5\text{mL}}{10\text{mL}}$ $C_2 = 3,75\text{mM}$
Dilución 3	$C_1 = 3,75\text{mM}$ $V_1 = 0,5\text{mL}$ $C_2 = ?$ $V_2 = 10\text{mL}$	$C_2 = \frac{3,75\text{mM} \times 0,5\text{mL}}{10\text{mL}}$ $C_2 = 187,5\mu\text{M}$

De esta manera, se calculó la concentración final de imidazol que quedó en la mezcla. Utilizando la solución buffer Tris 20mM y NaCl 100mM hasta un volumen total de 10mL, se diluyó la concentración de imidazol que se adicionó inicialmente (250mM), para quedar finalmente en 187,5µM. El volumen final de la muestra dializada, correspondiente a la enzima pura concentrada fue de 400µL.

2.5.5. Cuantificación de la betalactamasa mediante el método de Bradford

Para la cuantificación por el método de Bradford, se utilizó como parámetro estándar Albúmina de Suero Bovino (BSA), para la construcción de la curva de calibración y la obtención de la ecuación correspondiente, determinando la concentración de betalactamasa en el extracto obtenido anteriormente. En cada una de las concentraciones teóricas de BSA calculadas, se registraron absorbancias, como las que se pueden ilustrar en la Tabla 7. Empleando la ecuación (1), se determinó la cantidad de proteína de BSA usada en cada ensayo. Finalmente, con la ecuación de la gráfica correspondiente, se determinó la concentración experimental de la muestra de betalactamasa purificada anteriormente. La cantidad de proteína usada se obtiene a partir de la siguiente expresión:

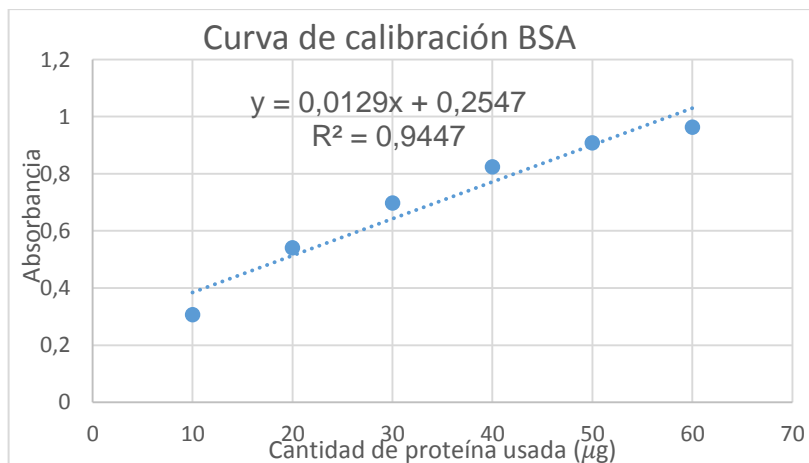
$$\text{Cantidad de proteína usada } (\mu\text{g}) = \text{Concentración solución madre } \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}\right) \times \text{Volumen solución madre añadida } (\mu\text{L}) \quad (1)$$

Para el primer ensayo de 1 μL de la solución madre y 1 μL del reactivo de Bradford, se realizó el cálculo de la siguiente manera:

$$\text{Cantidad de proteína } (\mu\text{g}) = \frac{10\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \times 1\mu\text{L} \quad (2)$$

$$\text{Cantidad de proteína } (\mu\text{g}) = 10\mu\text{g} \quad (2.1)$$

De la misma manera, se realizó el mismo procedimiento anterior para las demás alícuotas. A partir de los datos anteriores, se construyó la curva de calibración.



Gráfica 1. Curva de calibración de BSA para la cuantificación de la betalactamasa.

A partir de la ecuación de la gráfica, se determinó la concentración experimental de la betalactamasa previamente purificada, mediante una extrapolación con la

ecuación de Lambert Beer. La absorbancia a 595nm para el extracto enzimático fue de 0,516. Con base en lo anterior:

$$y = 0.0129X + 0.2547 \quad (3)$$

$$A_{595} = 0.516 = \frac{0.0129}{\mu\text{g } \beta\text{-lac}} (C) + 0.2547 \quad (3.1)$$

$$C = \frac{0.516 - (0.2547)}{0.0129} \quad (3.2)$$

$$C = 20.26\mu\text{g } \beta\text{-lac} \quad (3.3)$$

Como el volumen de enzima que se adicionó para cuantificar fue de 3μL, se determinó la concentración experimental de la muestra en μg/μL.

$$20.26\mu\text{g } \beta\text{-lac} \times \frac{1}{3\mu\text{L}} = 6.753 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} = 6.753 \frac{\text{g}}{\text{L}} \quad (3.4)$$

$$6.753 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ mol } \beta\text{-lac}}{39682,13 \text{ g}} = 1.702 \times 10^{-4} \text{ M} = 170.18 \mu\text{M de enzima } \beta\text{-lac}$$

La muestra inicial se diluyó en una proporción 1:10, lo que indica que el factor de dilución corresponde a 10. Ahora bien, la concentración final de la betalactamasa purificada fue:

$$170.18 \mu\text{M de enzima } \beta\text{-lac} \times 10 = 1701.8 \mu\text{M de enzima } \beta\text{-lac}.$$

Tabla 9. Concentraciones y absorbancias determinadas en la cuantificación por Bradford.

Volumen solución madre (μL)	Volumen Reactivo de Bradford (mL)	Cantidad de proteína (μg)	A ₅₉₅
1	1	10	0.306
2	1	20	0.540
3	1	30	0.697
4	1	40	0.824
5	1	50	0.908
6	1	60	0.963
Muestra Betalactamasa <i>P. fluorescens</i> purificada.			0.516

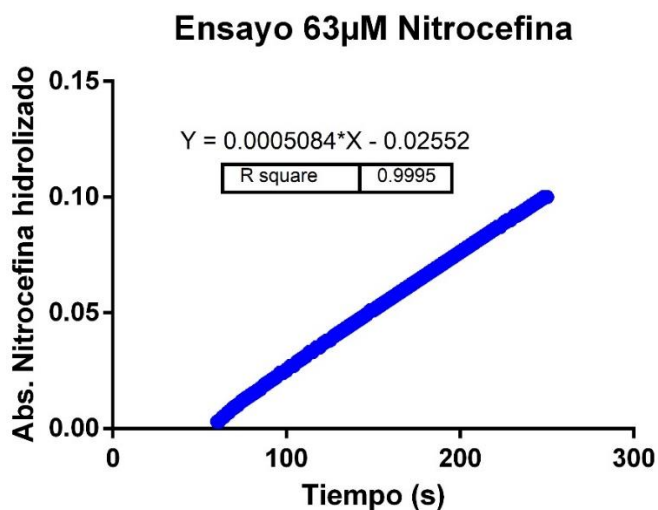
2.5.6. Ensayo cuantitativo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante con nitrocefina como sustrato.

Las soluciones de ensayo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante constituían diferentes reactivos, como se pueden ilustrar en la Tabla 4 del ítem 2.4.6. Con el objetivo de observar la cinética enzimática de forma más clara, se realizó una dilución 1:100000 a la muestra de enzima, hasta obtener una concentración final de 17.018nM.

$$875.92\mu M \times \frac{1}{100000} = 0.01702\mu M \times \frac{1000nM}{1\mu M} = 17.018nM \quad (5)$$

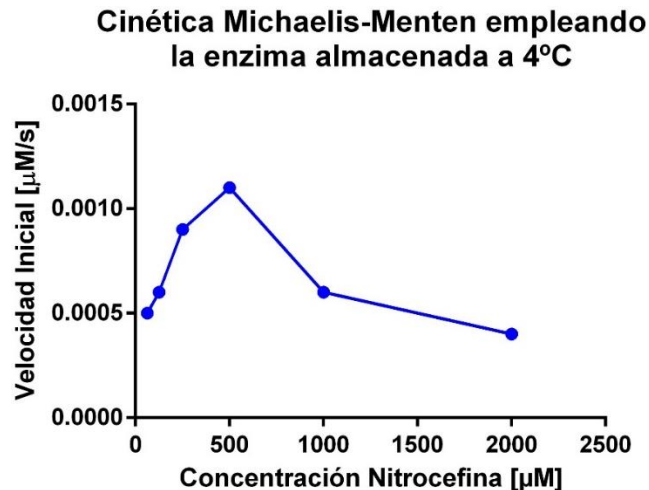
Se realizó el estudio a diferentes temperaturas de almacenamiento de la enzima recombinante, para determinar el efecto de la temperatura sobre su actividad. Por ende, la muestra que contenía la betalactamasa se separó en diferentes alícuotas para almacenarlas a 4°C y -80°C (sin adición de glicerol).

En cada solución de ensayo, se determinó la absorbancia del producto de nitrocefina hidrolizado por la acción de la betalactamasa. Estos datos se tomaron por segundo, hasta un tiempo final promedio de 5 minutos. Para los ensayos de actividad enzimática empleando la muestra que se almacenó a 4°C, se evaluaron las concentraciones de sustrato de 2mM, 1mM, 500µM, 250µM, 125µM y 63µM. En la Gráfica 2, se puede observar la absorbancia correspondiente al ensayo de actividad con nitrocefina 63µM, a través del tiempo.



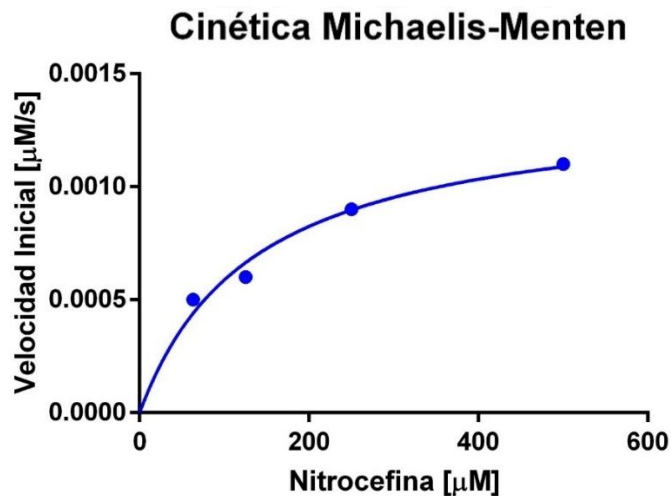
Gráfica 2. Ensayo de actividad enzimática con la betalactamasa almacenada a 4°C, a una concentración de nitrocefina de 63µM.

A partir de la Gráfica 2, se determinó la velocidad inicial de reacción, teniendo en cuenta la pendiente de la línea recta. De esta misma forma, se determinó las velocidades iniciales para las demás concentraciones de nitrocefina evaluadas, hasta obtener la cinética de Michaelis-Menten que se puede observar en la Gráfica 3.



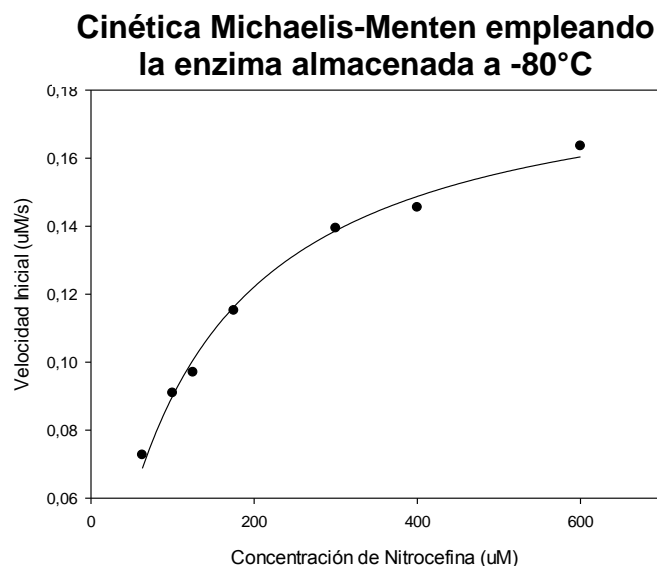
Gráfica 3. Cinética de Michaelis-Menten de la betalactamasa recombinante almacenada a 4°C.

De acuerdo con los resultados observados, la enzima presenta inhibición por sustrato cuando las concentraciones de nitrocefina son superiores a 500μM. Por lo tanto, para realizar el cálculo de los parámetros cinéticos de la enzima recombinante, se optó por omitir las concentraciones de nitrocefina a 1mM y 2mM de sustrato.



Gráfica 4. Cinética de Michaelis-Menten de la betalactamasa recombinante almacenada a 4°C.

Por otro lado, se realizaron los mismos ensayos de actividad enzimática con la betalactamasa almacenada a -80°C. Con base en los resultados anteriores, se evaluaron diferentes concentraciones de sustrato, inferiores al punto de inhibición por sustrato: 600μM, 400μM, 300μM, 175μM, 125μM, 100μM y 63μM. Nuevamente, a partir de las velocidades iniciales obtenidas en los ensayos de actividad a estas concentraciones, se obtuvo la cinética de Michaelis-Menten mediante el programa GraphPad Prism 7, observada en la Gráfica 5.



Gráfica 5. Cinética de Michaelis-Menten de la betalactamasa recombinante almacenada a -80°C.

2.5.7. Cálculo de parámetros cinéticos con los resultados experimentales de actividad enzimática para la betalactamasa recombinante.

De acuerdo con los resultados experimentales de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante, almacenada a diferentes temperaturas, se determinaron los parámetros cinéticos para cada caso. Mediante el programa GraphPad Prism 7, se calculó las constantes cinéticas de Michaelis (K_M) y velocidad máxima de reacción enzimática (V_{max}). Bajo estos resultados, se determinaron los demás parámetros: número de recambio (K_{cat}) y constante de especificidad (K_{cat}/K_M). Finalmente, se compararon los resultados experimentales, con los parámetros establecidos en la literatura, para realizar las discusiones y conclusiones pertinentes. La Tabla 9 ilustra los parámetros cinéticos obtenidos a partir de los ensayos de actividad utilizando la enzima almacenada a 4°C.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de la betalactamasa recombinante de *P. fluorescens* almacenada a 4°C.

Parámetro cinético	Valor experimental
K_M [μM]	135,6
V_{max} [$\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$]	0,0726
K_{cat} ($V_{max}/[E]$) [s^{-1}]	85,311
K_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$]	0.629
R^2 de la gráfica	0,9652

El número de recambio se calculó a partir del cociente entre la velocidad máxima (V_{max}) y la concentración total de la enzima. Como los ensayos de actividad enzimática tenían un volumen total de 100 μ L, a los cuales se les añadió 5 μ L de enzima a una concentración inicial de 0,01702 μ M, se determinó la concentración final de ésta, así:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (6)$$

$$(0.01702\mu M)(5\mu L) = C_2 (100\mu L) \quad (6.1)$$

$$C_2 = \frac{(0.01702\mu M)(5\mu L)}{(100\mu L)} \quad (6.2)$$

$$C_2 = 8.51 \times 10^{-4} \mu M \quad (6.3)$$

A partir de la concentración de enzima anterior, se determinó el número de recambio (K_{cat}), teniendo en cuenta la velocidad máxima de reacción enzimática, en unidades de μ M/s. Por ejemplo, empleando nitrocefina 63 μ M, se obtuvo una pendiente de 0.00051, que corresponde a unidades de absorbancia por segundo. Con la ley de Lambert-Beer, se obtuvo la concentración de enzima por segundo, a partir del coeficiente de extinción molar de la nitrocefina hidrolizada: $\epsilon = 16500 M^{-1} cm^{-1}$.

$$A = \epsilon bc \quad (7)$$

$$C = \frac{(0.00051)}{(1cm)(16500M^{-1}cm^{-1})} \quad (7.1)$$

$$C = \frac{3.091 \times 10^{-8} M}{s} \times \frac{10^6 \mu M}{1M} = 0.0309 \mu M \quad (7.2)$$

De este modo, se realizó la misma conversión para todas las pendientes obtenidas, y de ahí se obtuvo la cinética de Michaelis Menten. Finalmente, para obtener K_{cat} , se realizó el cociente entre V_{max} (0,0726 μ M. s^{-1}) y la cantidad de enzima expresada en la ecuación (6.3).

$$K_{cat} = \frac{0,0726\mu M}{s} \times \frac{1}{8.51 \times 10^{-4} \mu M \text{ enzima}} \quad (8)$$

$$K_{cat} = 85,311 s^{-1} \quad (8.1)$$

Finalmente, se determinó la constante de especificidad (K_{cat}/K_M) de la siguiente manera:

$$\frac{K_{cat}}{K_M} = \frac{85.311 s^{-1}}{135.6 \mu M} \quad (9)$$

$$\frac{K_{cat}}{K_M} = 0.629 s^{-1} \mu M^{-1} \quad (9.1)$$

Por último, se realizó el mismo procedimiento para los ensayos de actividad enzimática de la betalactamasa almacenada a -80°C . Estos se ilustran en la Tabla 9, y los cálculos se realizaron de manera similar a como se realizó anteriormente. La cinética de Michaelis Menten se ilustra en la Gráfica 5.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de la betalactamasa recombinante de *P. fluorescens* almacenada a -80°C .

Parámetro cinético	Valor experimental
K_M [μM]	111.2
V_{max} [$\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$]	0.1901
K_{cat} ($V_{\text{max}}/[\text{E}]$) [s^{-1}]	223.38
K_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$]	2.01
R^2 de la gráfica	0.9919

En la Tabla 10, se muestran los valores experimentales obtenidos.

Tabla 12. Parámetros cinéticos experimentales y teóricos de la betalactamasa recombinante de *P. fluorescens*.

Parámetro cinético	Valor experimental enzima almacenada a 4°C	Valor experimental enzima almacenada a -80°C	Valor teórico
K_M [μM]	135,6	111.2	116
V_{max} [$\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$]	0,0726	0.1901	
K_{cat} ($V_{\text{max}}/[\text{E}]$) [s^{-1}]	85,311	223.38	550
K_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$]	0.629	2.01	4.75
R^2 de la gráfica	0,9652	0.9919	

De acuerdo con lo anterior, la cinética de Michaelis-Menten que presentó un mejor ajuste de los datos, a partir del R cuadrado, fue la de la enzima que se almacenó a una temperatura de -80°C .

2.6. Discusión

Los métodos de transformación bacteriana involucran diferentes factores y condiciones que determinan el éxito del método a emplear. La transformación por choque térmico a 42°C fue exitoso para obtener las bacterias recombinantes de *Escherichia coli* BL21(DE3) con el plásmido pET-21b Pfluor-Betalac que codifica para la betalactamasa de *Pseudomonas fluorescens*. Las condiciones tenidas en cuenta para este proceso (cantidad del plásmido añadida, temperatura y tiempo de calentamiento), fueron proporcionadas por el trabajo de grado “CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA BETALACTAMASA DE *Pseudomonas fluorescens* PRODUCIDA DE FORMA RECOMBINANTE”, quienes también realizaron un pretratamiento al plásmido comercial para un correcto uso de ello, que involucraba resuspenderlo en buffer TE, con el objetivo de solubilizar el ADN inmerso para protegerlo de su degradación.

Las bacterias empleadas en este proceso eran *Escherichia coli* BL21(DE3), un tipo de cepa que contiene el bacteriófago λDE3. Estas bacterias, proporcionadas por la Universidad Icesi, fueron tratadas bajo una solución de cloruro de calcio (CaCl₂), con el objetivo de hacerlas competentes y aptas para recibir el DNA exógeno. Esta solución debilita la pared celular bacteriana para que el plásmido empleado pueda entrar fácilmente, con ayuda del calcio, que facilita la adsorción del ADN sobre la superficie celular. Por otro lado, el método de transformación por choque térmico promueve la desestabilización de la membrana celular, de manera que favorece la entrada del plásmido a la célula, a través de poros temporales que, finalmente, se cerraron por la temperatura a la cual fueron expuestas las bacterias (Serrano Rivero, Hernández García, & Fando Calzada, 2013).

A través de los controles de selección, se pudo evidenciar el éxito de la técnica. Mediante el control positivo, se evaluó viabilidad de las bacterias empleadas sin transformarse, ya que este medio no contenía el antibiótico que les impedía crecer en las placas. Esto permitiría asegurar el óptimo estado de los cultivos bacterianos sin transformarse, para esclarecer posibles orígenes de los errores cometidos en el método y descartar que estas pudiesen estar muertas o en condiciones desfavorables. Por otro lado, el control negativo correspondía a la ausencia de bacterias no transformantes, debido a la acción del fármaco. Como estas no tenían la capacidad de resistencia a la ampicilina, no lograron sobrevivir al medio, permitiendo una comparación precisa, respecto a los cultivos transformados. Finalmente, el control por bacterias competentes, siendo el más selectivo e importante, permitió evidenciar presencia de colonias correspondientes a las bacterias transformadas; las cuales, a pesar del medio suplementado con ampicilina, el plásmido presentaba la región que les confería resistencia al mismo fármaco.

Por otro lado, las pruebas de expresión y solubilidad de la betalactamasa obtenida de manera recombinante permitieron determinar las condiciones óptimas para

obtenerla en mayor cantidad de forma soluble o activa. De acuerdo con los resultados planteados en el trabajo de grado mencionado anteriormente, la enzima recombinante se expresaba mayoritariamente a una concentración IPTG de 0.2mM y a las 19 horas posteriores a la inducción, cuando se exponía a 37°C; además, esta se obtenía mayoritariamente en forma soluble, a partir de las concentraciones del inductor de expresión evaluadas (0.2, 0.4 y 1.0mM de IPTG).

En la metodología planteada para este trabajo, se optó por evaluar las concentraciones de IPTG añadidas a las bacterias previamente transformadas, además de la temperatura de crecimiento con la que fue expuesto el medio, una vez inducido con el mismo reactivo. Este último fue un factor fundamental para disminuir el estrés metabólico que se produciría en la expresión de la enzima recombinante a 37°C. Como las temperaturas evaluadas fueron inferiores a la mencionada anteriormente (la adecuada para el crecimiento de *Escherichia coli*), permitió que la cinética de crecimiento y expresión de la betalactamasa recombinante disminuyera considerablemente, promoviendo el espacio intracelular, para que la enzima pudiese plegarse de forma correcta, evitando así la formación de los cuerpos de inclusión.

De acuerdo con las pruebas de expresión, se realizó el análisis mediante electroforesis SDS-PAGE, identificando la banda que correspondía a la enzima de interés, ya que se encontraba entre los marcadores de peso de 37 y 50kDa, considerando que la betalactamasa de *Pseudomonas fluorescens* tenía un peso molecular de 39.7kDa. En las pruebas realizadas a temperaturas de crecimiento de 37°C y 27°C (temperatura ambiente), se pudo evidenciar una tendencia ascendente de intensidad en dicha banda, a medida que transcurrían las horas posteriores a la inducción. Esto se debe a que la bacteria continúa expresando el gen que le fue insertado, por lo que se observa cada vez más la cantidad de la enzima, sin tener en cuenta su condición de actividad (o solubilidad). No obstante, a una temperatura de 18°C, la cinética de crecimiento de la bacteria y expresión de la enzima se hace tan lenta, que no se observan cambios significativos, a pesar de analizarse 18 horas posteriores a este paso de inducción.

Los análisis de solubilidad de la enzima recombinante se vieron claramente diferenciados a una temperatura ambiente de crecimiento, ya que en las demás evaluadas, hay una tendencia a observarse la solubilidad de la enzima en una proporción 50:50. Las condiciones que determinaron mayor cantidad de betalactamasa en fracción soluble fueron las de concentraciones IPTG de 0.2mM (a la hora 4 y 7) y 0.6mM (a la hora 7) a temperatura ambiente. Sin embargo, por condiciones de mayoría en cantidad, impacto ambiental y económico, se optó por elegir el primero mencionado (IPTG 0.2Mm, hora 4). Si bien es sabido que el IPTG es un reactivo de alto costo, elegir la condición que requiera su menor cantidad, es un aporte económico (y a la vez ecológico) sostenible e importante.

La purificación de la enzima recombinante se realizó en un cultivo de 250mL, ya que este permitiría obtener la cantidad de enzima suficiente para los ensayos de

actividad enzimática, con las condiciones previamente establecidas. Antes de añadir el inductor IPTG, se dejó crecer el cultivo bacteriano hasta obtener una densidad óptica de 0.58; siendo el ideal para evitar el estrés metabólico en la expresión de la enzima hasta las 4 horas que se expondría a temperatura ambiente. Para un mejor análisis en el progreso de purificación, se realizó un gel de electroforesis SDS-PAGE, como el que se puede mostrar en la Figura 22, el cual se cuantificó por densitometría, evaluando proporcionalidad en las bandas para cada pozo.

A partir del progreso de purificación realizado, se pudo observar que la solubilidad de la enzima en el cultivo estaba en mayor proporción para la obtenida en forma activa, lo cual es un resultado óptimo para los ensayos posteriores. La sobreexpresión de la enzima fue evidente en el gel de electroforesis mostrado, corroborándose por el porcentaje de densidad de la banda respecto a las demás (36.9%). Una vez se adicionó el sulfato de estreptomina para eliminar la presencia de ADN y ARN en el medio, se observó que no hubo pérdidas significativas de la enzima de interés, debido al porcentaje de densidad observado (35.1). Posiblemente, la disminución en dicho porcentaje se atribuye a errores experimentales en el montaje de la muestra a la cámara de electroforesis, o al registro de cuantificación realizado.

El proceso de separación de proteínas comenzó con la calibración de la resina de níquel en la columna cromatográfica de Sigma Aldrich de 10cm de longitud (Figura 23). Debido a que esta se encontraba resuspendida en etanol y agua, se realizó la calibración, cambiando el medio con buffer de lisis (el mismo con que se encontraba la muestra expuesta al ultrasonido), para evitar así pérdidas de la enzima de interés.



Figura 23. Columna cromatográfica de Sigma-Aldrich empleada en la purificación de la enzima recombinante.

Una vez la muestra fue mezclada con la resina de níquel previamente calibrada en la columna, se dejó pasar todo el contenido a través de esta, colectando la fracción que correspondía al paso de equilibrio, o “Flow through”: las proteínas que no se unían a la resina de níquel. En este, se pudo observar que no hubo presencia considerable de la betalactamasa. Finalmente, se realizaron los dos lavados correspondientes con el buffer indicado, nuevamente sin observarse presencia de la enzima de interés.

Finalmente, se realizaron las cuatro eluciones correspondientes, con el objetivo de separar la enzima de la resina de níquel. El buffer de elución empleado contenía una cantidad de imidazol mayor que el anterior, con el objetivo de ampliar la competitividad en la unión con la resina de níquel, entre la cola de histidinas de la betalactamasa recombinante y el imidazol añadido, razón por la cual se incrementa considerablemente la concentración de este último. En la Figura 22 se puede observar que las tres últimas eluciones contenían la enzima en mayor cantidad. A pesar de que se pueden observar algunas bandas correspondientes a otras proteínas de *E. coli*, se puede concluir que el método de purificación tuvo un rendimiento mayor al 90%.

Se colectaron las fracciones correspondientes a las tres últimas eluciones, obteniendo un volumen final de 3mL. Debido a que el buffer de elución empleado contenía grandes cantidades de imidazol, se optó por dializar esta muestra mediante un dispositivo de filtro centrífugo Amicon® Ultra-15 10K (Figura 24). De esta manera, se logró reducir la concentración de imidazol disuelto, de 250mM a 187.5µM, centrifugando por triplicado el extracto enzimático. Dado que el filtro que contenía el dispositivo fue apto para dejar pasar las moléculas con un peso molecular menor a 1kDa, se aseguraba que la enzima de interés quedaría en la parte superior del mismo, ya que esta tenía un peso molecular de 39.7kDa. La diálisis de la betalactamasa recombinante permitiría remover el imidazol disuelto que pudiera afectar su viabilidad o actividad enzimática.

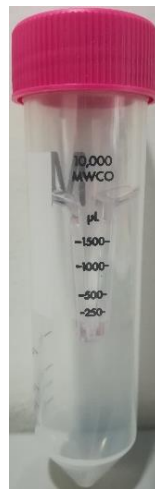


Figura 24. Dispositivo de filtro centrífugo Amicon® Ultra-15 10K

Por último, con la muestra dializada, se realizaron diferentes alícuotas del extracto enzimático para almacenarlos a temperaturas de 4°C y -80°C. Con los estudios de actividad enzimática para ambas muestras, se evaluó posibles afectaciones en la exposición a dichas temperaturas, a partir de la determinación de sus parámetros cinéticos. El sustrato empleado en estos ensayos fue la nitrocefina (Figura 25), un sustrato de betalactamasas de tipo cefalosporinasa, característica de poseer un anillo lactámico que es hidrolizado por la enzima; además de ser cromogénico, al cambiar de coloración amarilla a rojiza, mediante el reordenamiento de enlaces pi de la misma molécula.

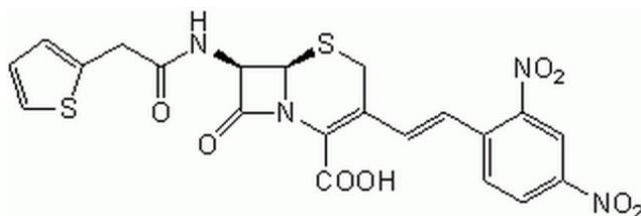


Figura 25. Estructura química de la nitrocefina.

Se efectuaron diferentes ensayos espectrofotométricos, con el que se varió la concentración del sustrato. Empleando la enzima que se almacenó a 4°C y -80°C, se evaluó su actividad a concentraciones de nitrocefina determinadas. Para tal fin, se realizó una dilución 1:100000 por partes (5 diluciones 1:10), ya que diferentes pruebas efectuadas indicaban que la enzima realizaba su actividad rápidamente, sin tener la oportunidad de evidenciar la gráfica con una tendencia, de tal forma que permitiese obtener la velocidad inicial en el ensayo evaluado. Finalmente, se determinó que a una concentración de 17.018nM de la betalactamasa recombinante, era evidente este resultado esperado.

De acuerdo con los parámetros cinéticos obtenidos, usando la enzima almacenada a 4°C, se pudo evidenciar la actividad de esta, comparando los datos experimentales con los teóricos que se reportan en la literatura. De acuerdo con la Tabla 12, el K_M reportado en la literatura es de 116 μ M, mientras que el experimental fue de 135.6 μ M, con un porcentaje de error de 16.9%. Por otro lado, el K_{cat} obtenido en estos ensayos fue de 85.311s⁻¹, lo que significa que una molécula de la betalactamasa recombinante hidroliza 85 moléculas de nitrocefina por cada segundo de reacción enzimática.

De acuerdo con los resultados anteriores, el número de recambio se encontró alejado del valor teórico que se encuentra reportado, al considerarse un porcentaje de error cercano al 85%. Sin embargo, a pesar de la lejanía de los resultados experimentales, es posible determinar que la enzima si se encontraba activa y que cumplía con lo esperado en los objetivos planteados.

No obstante, los parámetros cinéticos de la enzima que se almacenó a -80°C mostró mejores resultados. De acuerdo con el K_M calculado ($111.2\mu\text{M}$), el porcentaje de error determinado fue de 4.14%, un valor poco significativo para la comparación realizada. Por otro lado, de acuerdo con el K_{cat} , una molécula de betalactamasa hidrolizaba aproximadamente 223 moléculas de nitrocefina por segundo, obteniendo un porcentaje de error de 59.39%. A pesar de que este valor sigue siendo lejano al teórico, supone una actividad mayor que la otra muestra que se almacenó a 4°C ; concluyendo, de igual manera, que la enzima se encontraba activa.

Lo anterior asume que las temperaturas de almacenamiento de la enzima recombinante fueron el factor diferencial en los parámetros cinéticos calculados. Esto pudo deberse, principalmente, a que las temperaturas de almacenamiento de la enzima recombinante perjudicaran su actividad, dado que promoverían el precipitado por la formación de cuerpos de inclusión, o por la degradación de la enzima debido a otras moléculas presentes; con la diferencia que, a -80°C , la enzima se conservaba por más tiempo y no se degradaba tan rápidamente, como ocurriría con la muestra a 4°C . De esta manera, al haber menos cantidad de moléculas realizando actividad, la concentración asumida para dichos cálculos se hacía errónea, lo que permitió observarse una disminución en la constante catalítica. Cabe aclarar, además, que la concentración de enzima asumida para los ensayos involucraba todas las moléculas activas para hidrolizar el anillo lactámico de la nitrocefina.

Finalmente, con los parámetros establecidos para la betalactamasa de *P. fluorescens* obtenida de forma recombinante, se espera que puedan ser utilizados en posteriores análisis de actividad enzimática, con el objetivo de buscar posibles inhibidores de esta enzima que puedan ser empleados en diferentes estudios para formular estrategias en el uso de antibióticos betalactámicos.

2.7. Conclusiones

Los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo cumplieron con rigor los objetivos planteados anteriormente. Primeramente, se obtuvieron las condiciones óptimas de expresión y solubilidad de la betalactamasa de *P. fluorescens* que se produjo de manera recombinante en *E. coli* BL21(DE3); indicando que, a temperaturas más bajas que las empleadas en la reproducibilidad de *E. coli* (37°C), el estrés metabólico de expresión disminuye. Por otro lado, se logró purificar la enzima recombinante, a partir de un cultivo de 250mL de las bacterias transformadas e inducidas con las condiciones que se mencionaron previamente. A partir de las tres últimas eluciones obtenidas, se determinó una eficiencia en el método cercana al 90%, aunque se lograra evidenciar presencia de otras moléculas en el extracto enzimático. Finalmente, a partir de ensayos de actividad enzimática empleando nitrocefina como sustrato, se logró determinar los

parámetros cinéticos de dicha enzima, a partir de una muestra almacenada a -80°C . De aquí, es posible determinar que, a temperaturas muy bajas de almacenamiento, la enzima conserva por más tiempo su viabilidad funcional.

Finalmente, estos resultados podrían ser útiles para futuros estudios de inhibición competitiva, empleando sustratos que fuesen más afines a la nitrocefina, de tal forma que puedan ser comparables para establecer estrategias en el desarrollo de antibióticos betalactámicos con capacidad inhibitoria de betalactamasas.

2.8. Recomendaciones

Los parámetros cinéticos determinados en el presente trabajo deberían ser útiles para realizar comparaciones con otros sustratos empleados en los ensayos de actividad enzimática, partiendo de las constantes catalíticas y de especificidad obtenidas anteriormente. Dichas comparaciones resultarían ser importantes para la búsqueda de inhibidores competitivos, comparando parámetros cinéticos obtenidos experimentalmente. De acuerdo con la experiencia adquirida en el desarrollo de la metodología planteada, se pueden aplicar las condiciones óptimas de expresión y solubilidad de la enzima recombinante, para obtenerla en mayores cantidades, si el estudio posterior resulta ser muy extenso. Además, continuar con las concentraciones de NaCl e imidazol en los buffers preparados en el método de purificación, mantendría el rendimiento óptimo obtenido en este trabajo. Por otro lado, se recomienda realizar estudios de actividad con la enzima pura, lo más pronto posible, sin dejar transcurrir mucho tiempo para que no ocurra la degradación de la muestra obtenida. Además, se recomienda almacenar esta misma a temperaturas bajas, y resuspenderlas en glicerol, para una mejor conservación.

2.9. Referencias

- Abarca, G., & Herrera, M. L. (2001). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 1-5.
- Abraham, E. P. (1980). The Beta-Lactam Antibiotics. *Scientific American, INC*, 1-2.
- BIOLINE. (2007). *Description of IPTG (Dioxane-Free)*. Obtenido de BIOLINE: <https://www.bioline.com/fr/downloads/dl/file/id/2663/>
- BIOQUIMEXPERIMENTAL. (1995). *Bioquímica Experimental*. Obtenido de TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO II: TRANSFORMACIÓN: <https://bioquimexperimental.files.wordpress.com/2009/08/transfencia-de-material-genc3a9tico-ii1.pdf>
- C. Rodríguez, D., S. Ahammad, Z., A. Peñuela, G., & W. Graham, D. (2018). EFFECT OF β -LACTAMASES ASSOCIATED TO THE RESISTANCE OF β -LACTAM ANTIBIOTICS ON THE TREATMENT OF WASTEWATER. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4-5.
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández Cuenca, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). Procedimientos en Microbiología Clínica - Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Seimc*, 3-4.
- Castro Campo, T., & Valencia Torres, L. M. (2016). *CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA BETALACTAMASA DE Pseudomonas fluorescens PRODUCIDA DE FORMA RECOMBINANTE*. Santiago de Cali.
- Chen, J., Wang, Y., Qian, Y., & Huang, T. (2017). Fe(III)-promoted transformation of β -lactam antibiotics: hydrolysis vs oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 4-5.
- García Sánchez, J., Fresnadillo Martínez, M., Arce Arce, J., García Sánchez, E., López, R., & Prieto, J. (1999). Antibióticos betalactámicos: Antimicrobianos en Medicina. *Prous Science*, 213-249.
- Gómez, J., García Vázquez, E., & Hernández Torres, A. (28 de enero de 2015). *Los betalactámicos en la práctica clínica*. Obtenido de Documento de revisión.
- Icesi, F. d.-U. (2012). *Práctica 5: Cinética de la fosfatasa alcalina*. Santiago de Cali.

- Icesi, F. d.-U. (2012). *Práctica 6: Análisis de datos de cinética enzimática*. Santiago de Cali.
- Kelly, J. A., Dideberg, O., Charlier, P., Wery, J. P., Libert, M., Moews, P. C., . . . Ghuysen, J. M. (2014). On the Origin of Bacterial Resistance to Penicillin: Comparison of a β -Lactamase and a Penicillin Target. *Nature*, 1-2.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2007). *Principios de bioquímica*. Barcelona: OMEGA.
- Merck Millipore Corporation Ltd. Billerica, MA, U.S.A. (Octubre de 2014). User Guide. *Amicon Ultra-15 10K Centrifugal Filter Devices*. Billerica, United States.
- Michaux, C., Massant, J., Kerff, F., Frère, J.-M., Docquier, J.-D., Vandenberghe, I., . . . Wouters, J. (2008). Crystal structure of a cold-adapted class C beta-lactamase. *The FEBS Journal*, 4.
- Novagen. (2000). *BugBuster Protein Extraction Reagent*. United States & Canada: Novagen.
- QIAGEN. (2003). *The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*. QIAGEN.
- Reinthaler, F. F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., . . . Marth, E. (2010). ESBL-producing E. coli in Austrian sewage sludge. *ELSEVIER*, 2.
- Sociedad Mexicana de Ciencias Genómicas. (27 de abril de 2002). *Sociedad Mexicana de Ciencias Genómicas*. Obtenido de 1er Taller de Divulgación de las Ciencias Genómicas: "El DNA va a la escuela": http://smcg.ccg.unam.mx/actividades/divulgacion/1erTDCG_eldnavaalaescuela/doctos/3ra_sesion_TDCG.pdf
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Antibióticos betalactámicos. *ELSEVIER DOYMA*, 1-2.
- Serrano Rivero, Y., Hernández García, A., & Fando Calzada, R. (2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en Escherichia coli. *Revista CENIC - Ciencias Biológicas*, 2.
- Secretaría Distrital de Salud. (2010). *MANUAL DE ACTUALIZACIÓN EN RESISTENCIA BACTERIANA Y NORMAS CLSI M100 - S20 2010*. Bogotá.
- Yang, Y., Song, W., Lin, H., Wang, W., Du, L., & Xing, W. (2018). Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *ELSEVIER*, 1-2.

Anexos

Preparación del gel de electroforesis SDS-PAGE.

La preparación de los reactivos y el montaje de electroforesis SDS-PAGE se muestran en la **Tabla 3**, para un gel de corrida al 10% y de apilamiento al 6%. Se llevó a cabo el siguiente orden de adición de reactivos:

1. Agua Tipo 2
2. Buffer Tris (pH 6.8 para el gel de apilamiento y pH 8.8 para el gel de corrida)
3. Acrilamida
4. SDS 10%
5. Persulfato de amonio (PSA)
6. N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)*.
7. 2-propanol

*Agregar una ligera capa de Isopropanol, para asegurar una superficie plana y evitar contacto con el oxígeno atmosférico, el cual limita la polimerización.

Tabla 13. Reactivos requeridos para la preparación del gel de electroforesis SDS-PAGE.

Reactivo	Gel de apilamiento	Gel de separación
Acrilamida (mL)	0,75	3,75
Buffer (mL)	0,75 (pH 6,8)	2,5 (pH 8,8)
Persulfato de amonio (mL)	0,06	0,1
SDS 10% (mL)	0,06	0,1
TEMED (mL)	0,006	0,004
Agua (mL)	4,38	3,55
2-propanol (mL)	0,1	

Los reactivos se adicionaron en dos placas de vidrio correspondientes al montaje de electroforesis SDS-PAGE, separados por dos soportes en cada extremo.