



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y ESTRUCTURALES DE ENZIMAS  
CLAVE EN EL DESARROLLO Y METABOLISMO  
ANTIOXIDANTE DE *Vibrio parahaemolyticus*: GLUTAMATO  
RACEMASA Y GLUTARREDOXINA 2.**

---

Por:

**Leonardo Yame Fox Uribe**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

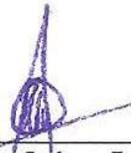
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Leonardo Yame Fox Uribe, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



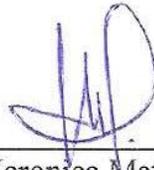
---

Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo  
Director de Tesis



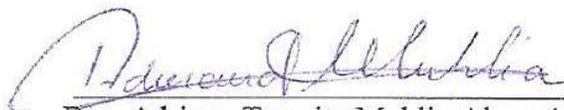
---

Dr. Adrián Ochoa Leyva  
Co-director



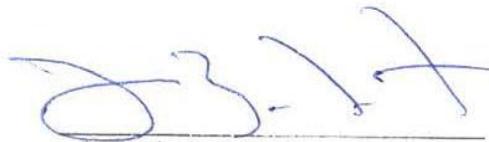
---

Dra. Verónica Mata Haro  
Integrante del comité de tesis



---

Dra. Adriana Teresita Muhlia Almazán  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Estudios Bioquímicos y Estructurales de Enzimas Clave en el Desarrollo y Metabolismo Antioxidante de *Vibrio parahaemolyticus*: Glutamato Racemasa y Glutarredoxina 2” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Leonardo Yame Fox Uribe, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**  
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer inicialmente a CONACYT por el apoyo otorgado para el desarrollo de la investigación durante el doctorado en ciencias, sin este no hubiera sido posible realizar los estudios de posgrado.

Agradezco a CIAD por haberme abierto las puertas desde el inicio en la Maestría en Ciencias hasta el Doctorado en Ciencias; centro de investigación que me ha formado en el quehacer científico. Llevo con orgullo y gratitud el haberme desarrollado en esta institución que me enseñó tanto y me concedió la oportunidad de aprender, conocer y crecer tanto académica y profesionalmente.

He de agradecer a los a los proyectos de financiación de equipo (INFR-2014-01-225455) y ciencia básica (CB-2014-01-237963), mediante los cuales fue posible realizar los estudios pertinentes en la presente investigación.

Es mi deseo agradecer de manera insondable a mi director de tesis el Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo, quien ha sido un pilar en la formación académica y personal de un servidor. Sólo los que viven las experiencias en el trabajo en equipo, conocen los bemoles necesarios a superar en el camino que transitamos. Gracias Roger recibe un fuerte abrazo.

También agradezco al comité de tesis integrado por Dr. Rogerio Sotelo Mundo, Dr. Adrián Ochoa Leyva, Dra. Verónica Mata Haro, Dr. Luis Brieba de Castro y Dra. Adriana Muhlia Almazán, por su infinito apoyo y guía para culminar los estudios de doctorado.

Agradezco también a la Dra. Karina García Orozco por su aporte y contrastes en los experimentos y análisis de laboratorio.

Un agradecimiento para mis compañeros de laboratorio, con quienes conviví a diario y se vivieron experiencias que después son anécdotas: Nacho, Lu, Cristóbal, Eva, Bruno, Alfredo y Shark-Caro.

Agradezco a la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna del Laboratorio de Genética y Biología

Molecular de Plantas en CIAD, tanto por su apoyo técnico como académico. También un agradecimiento a la Dra. Carmen Contreras Vergara por su apoyo y disposición para consultas y contrastes.

Agradezco a las coordinadoras de la CPA Dra. Herlinda Soto Valdez y Dra. Gloria Yepiz Plascencia que estuvieron al frente de la CPA a lo largo de los períodos pertinentes, durante los cuales siempre estuvieron en la mejor disposición de apoyar de la mejor manera para la realización y finalización de los estudios del posgrado.

Hago un especial agradecimiento a los integrantes y trabajadores de la CPA: Argelia Marín Pacheco, M.E. Verónica Araiza Sánchez, M.E. Laura Elizabeth García Cruz y Héctor Galindo Murrieta por su invaluable e indispensable labor.

Un gran reconocimiento y agradecimiento a la M.E. Aurora Vidal Martínez por su vital apoyo y disposición en el manejo de equipo técnico para videoconferencia, así como contar siempre con su atención para que éstas se llevaran a cabo exitosamente.

Es mi deseo agradecer muy entrañable y profesionalmente a Gerardo Reyna Cañez por su valioso apoyo técnico en la búsqueda de material bibliográfico, así como a los trabajadores de la Biblioteca de CIAD QB. Fernando Alejo Leyva Livshin y Luis Francisco Conde Ortiz por su incansable apoyo durante las jornadas de lectura e investigación bibliográfica.

Un agradecimiento especial a la Dra. Adriana Muhlia del Laboratorio Bioenergética y Genética Molecular en CIAD, tanto por sus comentarios de gran valor para el avance del proyecto como su apoyo en todo momento durante el doctorado.

Quiero agradecer también a la Dra. Vero Mata Haro del Laboratorio de Microbiología e Inmunología en CIAD, por su apoyo técnico y académico, así como por su contribución crítica y precisa con observaciones y sugerencias.

Especial agradecimiento a Dr. Luis Brieba por su aceptación y apoyo tanto técnico como académico durante la estancia de investigación en el Laboratorio de Bioquímica Estructural en

LANGEBIO, CINVESTAV, Irapuato; así como abrirme las puertas de su casa durante este tiempo.

Agradezco especialmente al Dr. Adrián Ochoa y co-director de tesis del Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM en Cuernavaca, Morelos; quien me abrió las puertas y aceptó para realizar una estancia de Investigación en dicha institución. Igualmente, a todos los integrantes de 8a lab, con quienes tuve la oportunidad de convivir, aprender y crecer: Fer, Luigui, John-π, Aby, Miriam, Axel, Edgar, Melany, Juan Manuel, Marco, Kob y Gama.

Le agradezco insondablemente al Biól. Filiberto Sánchez López por su apoyo y colaboración en sugerencias y enseñanzas durante los experimentos; así como por su asistencia y respaldo personal e incondicional en todo momento para llevar a cabo la estancia de investigación en el IBt.

Agradezco también a la Dra. Gloria Saab Rincón e Ing. Leticia Olvera Rodríguez del Grupo Ingeniería Celular y Biocatálisis en el IBt por su disposición y apoyo académico y uso de equipos para el desarrollo de experimentales.

Quiero agradecer a mis compañeros y colegas del IBt; quienes estuvieron presentes en todo momento, con contrastes, matices y experiencias únicas: Coralito, David, Cabo y Citlali; gracias a ustedes fue posible vivir más experiencias para contarlas.

Agradezco especialmente a la Dra. Yedith Soberanes Duarte en el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la UNISON, por sus aportes teóricos y prácticos, así como su apoyo durante los experimentales.

Quiero hacer un agradecimiento muy especial al Dr. Javier Hernández Paredes en el Departamento de Física de la UNISON, por su invaluable aporte en conocimiento y sugerencias críticas en el desarrollo de los experimentos para la caracterización de compuestos quirales.

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de vivir y superar cada reto nuevo que se presenta en la vida, así como a mis padres que siempre me han brindado su apoyo total y cariño.

Finalmente, quiero agradecerle a mi pareja, novia, amiga y colega M.C. Rosa Nitzia Arce Carrillo

por su respaldo y amor incondicional en todo momento, así como por sus sugerencias y críticas constructivas para mejorar y pulir la redacción de la presente tesis de investigación doctoral.

## **DEDICATORIA**

«Lo importante en la ciencia no es tanto obtener nuevos datos,  
sino descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos».

William Lawrence Bragg

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	8
<b>CONTENIDO</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	12
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	19
2.1. Glutamato racemasa – VpGluR.....	19
2.2. D-glutamato:cloro – D-Glu:Cl .....	21
2.3. Glutarredoxina 2 – VpGrx2.....	22
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	26
4.1. Objetivo General .....	26
4.2. Objetivos Específicos .....	26
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
5.1. VpGluR.....	27
5.1.1. Sobreexpresión Heteróloga de VpGluR .....	27
5.1.2. Solubilización y Replegamiento de VpGluR.....	28
5.1.3. Purificación de VpGluR por Cromatografía de Afinidad (IMAC).....	29
5.1.4. Determinación de la Estructura Cuaternaria de VpGluR.....	30
5.1.5. Actividad Enzimática de VpGluR .....	31
5.1.6. Experimentos de Difracción, Rayos-X y Colecta de Datos.....	31
5.1.7. Modelo Estructural 3D in silico de VpGluR .....	32
5.2. D-Glu:Cl.....	32
5.2.1. Síntesis y Cristalización de D-Glu:Cl.....	32
5.2.2. Difracción de Rayos-X de Monocristal de D-Glu:Cl .....	33
5.2.3. Configuración absoluta de D-Glu:Cl y validación del modelo.....	33
5.3. VpGrx2 .....	34
5.3.1. Preparación del ADN plasmídico (ADNp) de VpGrx2 .....	34
5.3.1.1. Ligación del gBlock de VpGrx2 en el vector de clonación pJET1.2/blunt. ....	35
5.3.1.2. Obtención del ADNp (pJET1.2/blunt-gBlock) de VpGrx2 .....	35
5.3.1.3. Digestión del ADNp (pJET1.2/blunt-gBlock) y el vector de expresión pET11a .....	36
5.3.1.4. Ligación del gBlock de VpGrx2 en el vector de expresión pET11a.....	37

## CONTENIDO (continuación)

5.3.1.5. Obtención del ADNp (pET11a-gBlock) de VpGrx2 .....	37
5.3.2. Sobreexpresión Heteróloga de VpGrx2 en E. coli.....	38
5.3.3. Purificación de VpGrx2 .....	39
5.3.3.1. Cromatografía de afinidad (IMAC). .....	39
5.3.3.2. Cromatografía por filtración en gel o exclusión molecular (SEC) .....	40
5.3.4. Actividad Enzimática de VpGrx2.....	40
5.3.4.1. Actividad tipo GRX. ....	41
5.3.4.2. Actividad tipo GST (híbrida). ....	41
5.3.5. Modelo Computacional 3D de VpGrx2.....	41
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
6.1. Glutamato racemasa – VpGluR.....	43
6.1.1. Sobreexpresión heteróloga de VpGluR .....	43
6.1.2. Replegamiento in vitro de VpGluR .....	44
6.1.3. Purificación de VpGluR por cromatografía de afinidad y exclusión molecular.....	45
6.1.3.1. Purificación de VpGluR por IMAC. ....	45
6.1.3.2. Purificación de VpGluR por filtración en gel y determinación de su estructura cuaternaria .....	46
6.1.4. Cristalización de VpGluR.....	48
6.1.5. Modelo estructural 3D in silico de VpGluR .....	49
6.1.6. Actividad enzimática de VpGluR .....	53
6.2. D-Glutamato:cloro – D-Glu:Cl.....	56
6.2.1. Estructura cristalográfica de D-Glu:Cl .....	56
6.2.1.1. Orientación y configuración absoluta teórica de la estructura cristalográfica D-Glu:Cl. ....	59
6.2.2. Asignación experimental de la configuración absoluta de D-Glu:Cl en base a su estructura cristalográfica.....	60
6.3. Glutarredoxina 2 – VpGrx2.....	66
6.3.1. Expresión heteróloga de VpGrx2 .....	66
6.3.2. Purificación de VpGrx2 por cromatografía de afinidad y exclusión molecular. ....	67
6.3.2.1. Purificación de VpGrx2 por IMAC. ....	67
6.3.2.2. Purificación de VpGrx2 por filtración en gel y determinación de su estructura cuaternaria. ....	68
6.3.3. Modelo 3D in silico de VpGrx2 .....	69
6.3.4. Actividad enzimática de VpGrx2 .....	72
6.3.4.1. Actividad tipo GRX de VpGrx2. ....	72
6.3.4.2. Actividad tipo GST (híbrida) de VpGrx2. ....	73
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>78</b>
<b>10. APÉNDICES.....</b>	<b>86</b>
10.1. Apéndice A – VpGluR: Preparación de soluciones y medios .....	86
10.2. Apéndice B – VpGrx2: Preparación de soluciones y medios.....	88

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Moléculas clave en el desarrollo e infección de <i>V. parahaemolyticus</i> en camarón blanco ( <i>L. vannamei</i> ).....	17
2	Cinética de sobreexpresión de VpGluR.....	43
3	Tratamiento y disolución de los cuerpos de inclusión de VpGluR para replegamiento <i>in vitro</i> .....	45
4	Purificación de VpGluR por IMAC.....	46
5	Purificación de VpGluR por SEC.....	47
6	Condiciones de cristalización de VpGluR.....	48
7	Modelo estructural predictivo 3D de VpGluR.....	50
8	Alineamiento de la secuencia aminoacídica de VpGluR y otras racemasas.....	52
9	Actividad enzimática de VpGluR.....	54
10	Representación ORTEP de la unidad asimétrica de D-Glu:Cl.....	57
11	Configuración absoluta de D-Glu:Cl.....	59
12	Pares de Bijvoet y análisis estadístico de D-Glu:Cl (R) (arriba) y D-Glu:Cl (S) (abajo).....	63
13	Configuración absoluta de D-Glu:Cl (R) obtenido por difracción de rayos X..	64
14	Cinética de sobreexpresión de VpGrx2.....	66
15	Purificación de VpGrx2 por IMAC.....	67
16	Purificación de VpGrx2 por SEC.....	68
17	Modelo 3D estructural de VpGrx2 obtenido mediante Phyre2.....	70
18	Alineamiento de la secuencia aminoacídica de VpGrx2 frente a otras glutarredoxinas.....	71

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Datos cristalográficos experimentales de D-Glu:Cl (R) y D-Glu (S).....	58
2	Valores de los parámetros de configuración absoluta para D-Glu:Cl (R) y D-Glu (S).....	61
3	Actividad enzimática tipo GRX de VpGrx2 comparado con otras glutarredoxinas.....	72
4	Actividad enzimática tipo GST (híbrida) de VpGrx2 comparado con otras GST's.....	73

## RESUMEN

*Vibrio parahaemolyticus* se ha relacionado al síndrome de mortalidad temprana (SMT) del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), generando un problema de salud y económico en la acuicultura a nivel global. Es por ello que se buscan alternativas para contrarrestar su crecimiento e infección a través de la investigación de enzimas y sustratos clave en el desarrollo de este patógeno. En el presente trabajo, se caracterizaron dos proteínas, la glutamato racemasa (VpGluR) y la glutarredoxina 2 (VpGrx2) así como el sustrato de VpGluR, el glutamato (D-Glu), mismos que son claves en el desarrollo de la bacteria. La VpGluR se sobreexpresó de manera insoluble en cuerpos de inclusión los cuales se solubilizaron y replegaron de manera *in vitro* y se purificó por cromatografía de afinidad y exclusión molecular. Se determinó el estado oligomérico de VpGluR y se obtuvo un modelo 3D *in silico*; sin embargo, bajo el proceso experimental realizado en este estudio la proteína no fue funcional. El sustrato D-Glu se caracterizó estructuralmente mediante cristalografía y difracción de rayos X. D-Glu cristalizó con un átomo de cloro (D-Glu:Cl). Con lo cual se obtuvieron los parámetros de configuración absoluta (Flack, Parsons, Hooft), por lo que se asignó la configuración absoluta del compuesto como D-Glu:Cl(R). Por otra parte, la VpGrx2 se sobreexpresó de manera soluble y se purificó secuencialmente por cromatografía de afinidad y exclusión molecular. Se determinó el estado oligomérico de VpGrx2 como monómero y se determinó su actividad enzimática *in vitro*. La proteína presentó actividad como proteína Grx (redox) así como una actividad catalítica tipo GST (transferasa). Sin embargo, presentó mayor actividad enzimática de hasta dos órdenes de magnitud superior como transferasa al compararla con la actividad tipo redox. La investigación de dichas enzimas y sustratos permitió una mayor comprensión de los mecanismos de defensa de *V. parahaemolyticus*, lo que concederá en un futuro a mediano o largo plazo contrarrestar los efectos negativos del mismo en la acuicultura.

**Palabras clave:** cristalografía, difracción de rayos X, configuración absoluta, glutamato y glutarredoxina.

## ABSTRACT

*V. parahaemolyticus* has been linked to the early mortality syndrome (EMS) of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), generating a health and economic problem in global aquaculture. This is the reason that alternatives are currently being sought to counteract its growth and infection through the research of key enzymes and substrate in the development of this pathogen. Thus, two key proteins (VpGluR, VpGrx2) in the development of this bacteria and the substrate of VpGluR (D-Glu) were characterized. VpGluR was overexpressed in insolubly way in inclusion bodies which were solubilized and refolded *in vitro* and purified by affinity and molecular exclusion chromatography. The oligomeric state of VpGluR was determined and a 3D model *in silico* was obtained however, the protein was not functional. The D-Glu substrate was structurally characterized by crystallography and X-ray diffraction, which crystallized with a chlorine atom (D-Glu:Cl). The above allowed to perform statistical analyzes and obtain the absolute configuration parameters (Flack, Parsons, and Hooft) which granted to assign correctly and unambiguously the absolute configuration of the compound as D-Glu: Cl(R). On the other hand, VpGrx2 was overexpressed in a soluble manner and was sequentially purified by affinity chromatography and molecular exclusion. The oligomeric state of VpGrx2 was determined as a monomer. The protein was functional, however, it presented greater catalytic activity type GST (transferase) than as GRX protein (redox), which gives VpGrx2 to be a bifunctional protein, such as *E. coli* glutaredoxin 2 (EcGrx2). The studies of these enzymes and substrates allowed a better approach and understanding of the defense mechanisms *V. parahaemolyticus*, which will grant in the medium or long-term future to counteract its negative effects on aquaculture.

**Keywords:** crystallography, X-ray diffraction, absolute configuration, glutamate and glutaredoxin.

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura utiliza técnicas y métodos para la producción de alimentos de origen marino y generar así un modelo económico a partir de los mismos. El cultivo de camarón o camaronicultura es uno de los más relevantes a nivel mundial debido a su valor económico. La acuicultura del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) busca satisfacer la demanda en el mercado y se extiende a nivel global; éste se cultiva en países asiáticos como China, Vietnam, Tailandia, Japón, etc., así como en países de América como Chile, Brasil y México. En el 2018 se ubicó a México como el séptimo productor a nivel mundial con 230,381 toneladas (2.7%), de las cuales el 73% proviene del cultivo, teniendo como principales productores a los estados de Sinaloa y Sonora (42.6 y 34.1% respectivamente) (SIAP, 2019, Panorama Agroalimentario). La importancia de este cultivo radica en los ingresos económicos que representa para el país, tan sólo en los primeros ocho meses del 2019 se obtuvieron de sus exportaciones 158.9 millones de dólares y se proyecta que la producción del camarón incremente en 3% (237,298 toneladas) con respecto al año anterior (SIAP, 2019, Expectativas Agroalimentarias Octubre).

La producción de camarón blanco en México atravesó por una crisis a partir del año 2013, al verse afectado su cultivo por una infección que ocasiona su muerte prematura, conocida como Síndrome de Mortalidad Temprana (SMT o EMS por sus siglas en inglés). Dicha enfermedad se ha asociado a cepas específicas de *Vibrio parahaemolyticus*, las cuales no contienen los marcadores genéticos de las cepas enteropatógenas para el humano y aunque éstas son del mismo género y especie, parecen ser de linajes distintos (Lee *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017). La problemática generada por dicha enfermedad va desde la merma de los camarones y cultivos hasta cuantiosas pérdidas económicas.

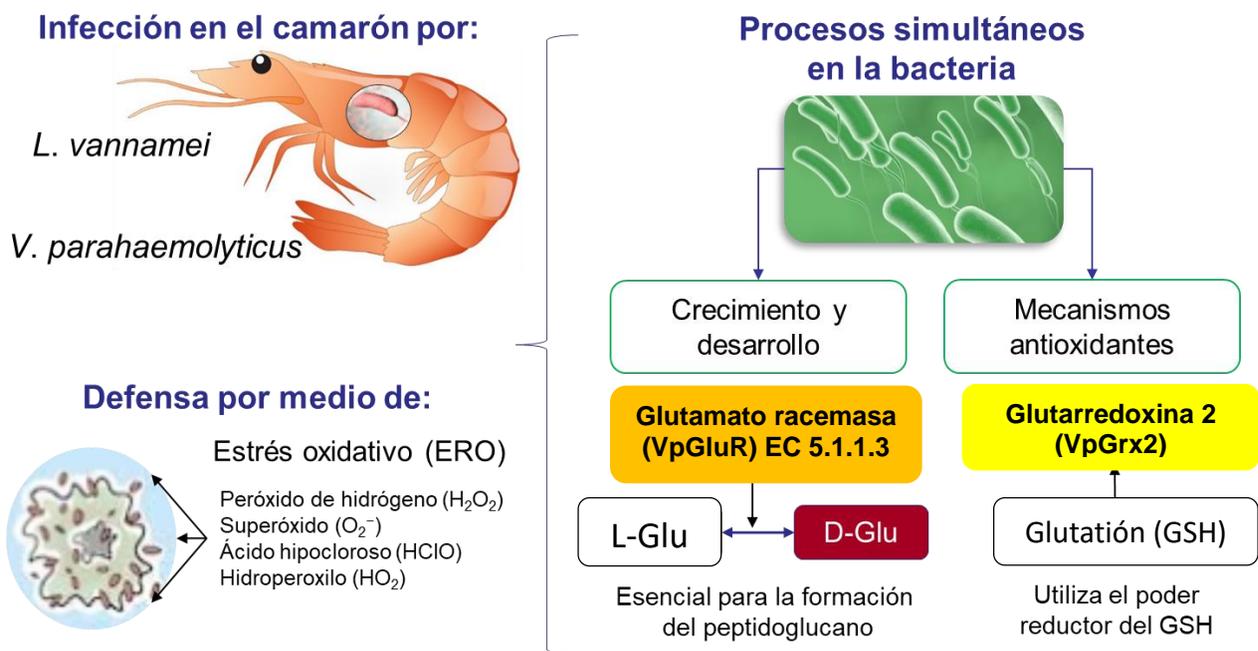
Se ha determinado que el agente relacionado a la enfermedad SMT, es una bacteria dentro del grupo de vibrionales (*Vibrio parahaemolyticus*) (Tran *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2017). Ésta es una bacteria gram negativa, anaeróbica facultativa y presenta un flagelo polar que permite su motilidad; se encuentra de manera natural en los cuerpos de agua de mar, estuarios, así como en las zonas de cultivo del camarón y en su microbiota intestinal (Ceccarelli *et al.*, 2013; Urquhart *et al.*, 2016; Cornejo-Granados *et al.*, 2017). *V. parahaemolyticus* presenta diversas

proteínas que permiten su adaptación, desarrollo y crecimiento, tanto en su medio natural como en el organismo hospedero en el proceso de infección. Durante el crecimiento celular, la bacteria cuenta con enzimas que participan en la síntesis del peptidoglucano en la pared celular, como la glutamato racemasa (GluR – E.C. 5.1.1.3) cuya función es llevar a cabo la isomerización reversible del L-glutamato (L-Glu) a D-glutamato (D-Glu), siendo éste último esencial para la formación y entrecruzamiento del peptidoglucano (Fisher, 2008; Conti *et al.*, 2011). De la misma manera, cuando se presenta un estrés oxidativo, *V. parahaemolyticus* posee proteínas antioxidantes como la glutarredoxina 2 (Grx2) para contrarrestar los efectos negativos del mismo; la Grx2 realiza su función reductora a través del poder reductor del glutatión (GSH), ya sea desde reducir compuestos oxidativos como especies reactivas de oxígeno (ROS), realizar la S-glutationilación reversible de proteínas como mecanismo de control y protección, hasta mantener el balance redox dentro de la célula (Silhavy *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014).

La pared celular es vital para la sobrevivencia de *V. parahaemolyticus*, ya que ésta cumple con diversas funciones en la célula. Confiere forma y resistencia a la bacteria, permite el paso selectivo de nutrientes hacia el interior, así como excreción de desechos hacia el exterior, protege a la célula de los cambios osmóticos de presión y mantiene la turgencia citoplasmática gracias a la rigidez de la estructura del peptidoglucano (Silhavy *et al.*, 2010; Sleytr *et al.*, 2010). El D-Glu es un componente indispensable que ocupa la segunda posición en el pentapéptido (L-Ala-D-Glu-DAP-D-Ala-D-Ala) que permite el entrecruzamiento del peptidoglucano (Claus & König, 2010; Arthur, 2016). Se ha visto que la enzima GluR es esencial en la ruta de biosíntesis del peptidoglucano de tal manera que la eliminación de su gen codificante es letal para la célula (Baba *et al.*, 2006; Goodall *et al.*, 2018); por lo que se han caracterizado de manera *in vitro* diversas GluRs como proteínas blanco de organismos patógenos como *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre otros, con la finalidad de buscar y diseñar inhibidores específicos basados en su estructura (Lundqvist *et al.*, 2007; Whalen *et al.*, 2010).

La glutamato racemasa de *V. parahaemolyticus* (VpGluR) es una enzima clave en el crecimiento y desarrollo de este patógeno para el camarón blanco; sin embargo cuando el hospedero es infectado por un agente infeccioso éste se defiende para contrarrestar la infección (figura 1). Uno de los mecanismos de defensa del hospedero es por medio de la generación de compuestos oxidantes como las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS se producen como una bomba

oxidativa (oxidative burst) al incrementar su concentración celular para oxidar las moléculas, principalmente proteínas, del agente patógeno y así defenderse del mismo (Gallogly *et al.*, 2009; Loi *et al.*, 2015; Ezraty *et al.*, 2017). Sin embargo, las bacterias cuentan con una batería de proteínas antioxidantes como medida de contrapartida a la bomba oxidativa, tales como tiorredoxinas, súper-óxido dismutasa, peroxirredoxinas y glutarredoxinas, como lo es la glutarredoxina 2 de *V. parahaemolyticus* (VpGrx2) (Gomez-Jimenez *et al.*, 2014). Estas proteínas redox le conceden a la bacteria la capacidad de defenderse y continuar su crecimiento y desarrollo, así como modular la presencia de ROS al interior de la célula (Zaffagnini *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009; Ezraty *et al.*, 2017). Por tal motivo se ha vuelto imperativa la búsqueda de tratamientos efectivos en contra del patógeno, mismo que es posible indagar mediante la caracterización de moléculas blanco presentes en *V. parahaemolyticus* (Ghenem *et al.*, 2017; Ashrafudoulla *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Moléculas clave en el desarrollo e infección de *V. parahaemolyticus* en camarón blanco (*L. vannamei*). La bacteria infecta al camarón, por lo que éste produce compuestos oxidativos como mecanismo de defensa. Durante la infección, la bacteria continúa creciendo y desarrollándose, para lo que cual se requiere a la enzima VpGluR que isomeriza al glutamato a D-Glu; mientras que la VpGrx2 utiliza el poder reductor del GSH como antioxidante.

Una de las herramientas más poderosas para la caracterización estructural *in vitro* de dichas moléculas, es a través de la cristalización y difracción por rayos X. Un campo de investigación que

se apoya en las técnicas y métodos de laboratorio antes mencionado, es la caracterización y diseño de fármacos y antimicrobianos de nueva generación, basados en la estructura de moléculas blanco, de bacterias y organismos patógenos en los alimentos de consumo humano (Santos *et al.*, 2017). Es por ello que la presente investigación abarca el estudio y caracterización, desde un enfoque bioquímico y estructural, moléculas blanco de *V. parahemolyticus* como VpGluR y su sustrato el D-Glu necesarios para el crecimiento y desarrollo de la bacteria, así como a la VpGrx2 como parte de su sistema antioxidante. De esta manera, el estudio de proteínas blanco en el desarrollo, crecimiento y protección antioxidante de los organismos patógenos del camarón blanco, como *V. parahaemolyticus*, se vuelve fundamental para la inhibición y desarrollo de antimicrobianos en un futuro próximo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Glutamato racemasa – VpGluR

La GluR es una enzima independiente del cofactor piridoxal 5 'fosfato (PLP) que cataliza la reacción de isomerización del L-Glu a su estereoisómero D-Glu el cual es esencial en la estructura del peptidoglucano de la pared celular (Heijenoort, 2001; Ashiuchi *et al.*, 2013), tanto de bacterias Gram positivas como negativas como lo es *V. parahaemolyticus* (Gallo & Knowles, 1993; Espaillet *et al.*, 2014). Se sabe que, para que se lleve a cabo lo anterior, es necesario que se encuentre disponible intracelularmente una cantidad suficiente de D-Glu suficiente, por lo que la presencia de la enzima GluR es esencial para la síntesis del peptidoglucano y sobrevivencia de la bacteria (Doublet *et al.*, 1993; Espaillet *et al.*, 2014). La importancia del peptidoglucano para la bacteria radica en que éste le confiere rigidez y mantiene la estructura externa celular, confiere protección y resistencia a la bacteria frente a diversos factores de estrés ambientales, tales como cambios osmóticos y/o de presión, estrés oxidativo así como resistencia a antibióticos (Silhavy *et al.*, 2010; Ezraty *et al.*, 2017). Es debido a lo anterior que las investigaciones en GluRs se han realizado bajo dos enfoques, el primero mediante la caracterización bioquímica y estructural de las enzimas como proteínas blanco (Lundqvist *et al.*, 2007; Fisher, 2008; Conti *et al.*, 2011) y segundo por medio de la búsqueda de compuestos inhibidores basados en la estructura análoga del glutamato (Soda, 2006; Fisher, 2008; Conti *et al.*, 2011).

El estudio de las GluRs en diversas bacterias como *Lactobacillus* spp., *Aquifex pyrophilus*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecium* y *Vibrio* spp., entre otros; he permitido dilucidar la estructura y propiedades bioquímicas de este grupo de enzimas (Doublet *et al.*, 1992; Hwang *et al.*, 1999; Lundqvist *et al.*, 2007; Elmahdi *et al.*, 2016). Las GluRs de *L. fermenti* y *Pediococcus* spp. fueron las primeras enzimas en caracterizarse bioquímica y estructuralmente, donde se observó que el mecanismo de acción enzimática para la isomerización consiste en dos pasos, donde las cisteínas (C73 y C184) conservadas del sitio activo son necesarias para su función. La C73 se encarga de deprotonar el L-Glu, se forma un enolato en estado intermedio estabilizado (base de Schiff) y posteriormente se protona del lado contrario del Glu por

medio de la C184 para formar el D-Glu (Choi 1992, Tanner 1993, Tanner 2002). La presencia de dichas cisteínas conservadas en el sitio activo, así como el mecanismo de acción catalítica se ha visto que se presenta siempre en todas las GluRs, por lo que estas características son ubicuas en este tipo de enzimas (Gallo et al., 1993; Glavas and Tanner, 1999; Hwang et al., 1999; Kim et al., 1999; Lundqvist et al., 2007; May et al., 2007).

Las evidencias en la estructura de las GluRs muestran que la proteína presenta diferencias en su estructura y mecanismos de regulación dependiendo del organismo al que pertenezcan. Diversos estudios resaltan que la mayoría de las enzimas GluR presentan una estructura cuaternaria dimérica, como la GluR homodimérica de *H. pylori* (HpGluR). Una característica única de HpGluR es que la cavidad del sitio activo de cada monómero, se orientan hacia la interfase dimérica, por lo tanto, hacia al interior de la proteína. Esto es un mecanismo de control estricto, ya que no permite la entrada al sitio activo de una molécula distinta al sustrato. A diferencia de la HpGluR, las GluRs homodiméricas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, presentan el sitio activo alejado de la interfase dimérica, por lo que éste queda orientado hacia el exterior de manera expuesta, lo que facilita el contacto con el sustrato y llevar a cabo la isomerización reversible del Glu cuando sea necesario para la bacteria (Lundqvist 2007; Fischer 2008).

La GluR de *Escherichia coli* (EcGluR) es una enzima que presenta características distintivas a la mayoría de las racemasas descritas anteriormente. La estructura cristalográfica de EcGluR mostró que ésta presenta una estructura terciaria monomérica (Doublet *et al.*, 1994); sin embargo, aunque ésta requiere del cofactor PLP para llevar a cabo la catálisis, sí necesita de un activador. La EcGluR presenta una región orientada de manera contraria al sitio activo en la estructura, de tal manera que ésta región funge como el sitio de unión al activador UDP-*N*-acetilmuramil-L-Ala (molécula precursora en la síntesis del peptidoglucano) (Doublet *et al.*, 1996; Glavas & Tanner, 2001; Lundqvist *et al.*, 2007); debido a lo cual la EcGluR se activará al momento de entrar en contacto con dicha molécula. Por otra parte, se encontró que la EcGluR presenta una función alterna distinta como proteína moonlightint (Moore, 2004; Jeffery, 2016), ya que ésta participa en la regulación de la síntesis del ADN al inhibir de manera endógena, como mecanismo de regulación descendente, de la ADN girasa (Ashiuchi *et al.*, 2002; Collin *et al.*, 2011; Sengupta *et al.*, 2008).

Es por ello que las GluR se han convertido en proteínas blanco en diversas investigaciones, por lo que se han sintetizado varios inhibidores específicos para GluR de diversas bacterias (*E. coli*, *Lactobacillus* spp., etc.) como el D-N-hidroxiglutamato (Glavas & Tanner, 1997) o el heteroaril-glutamato (De Dios *et al.*, 2002), cuyo diseño se basó en la estructura cristalográfica de dichas enzimas (Choi *et al.*, 1994; Sengupta *et al.*, 2008; Pal & Bearne, 2014). Actualmente, se han depositado 28 estructuras de GluR en el banco de datos de proteínas – Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), todas ellas pertenecientes a bacterias, siendo de especial interés la EcGluR (2JFNA) (Lundqvist *et al.*, 2007), proteína que comparte el 54% de identidad en su secuencia de aminoácidos con la VpGluR. Mediante estudios genómicos y moleculares de *V. parahaemolyticus* (Nunan *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014), se logró identificar a una cepa patógena para el camarón blanco (*L. vannamei*) causante del SMT que afecta significativamente su sanidad acuícola y producción (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010; Nunan *et al.*, 2014), de donde se obtuvo la secuencia de VpGluR para el presente estudio. Lo anterior destaca la importancia de su estudio y caracterización como proteína blanco el diseño de inhibidores específicos basados en su estructura, con el enfoque de desarrollar nuevos fármacos o medicamentos dirigidos a dicha enzima.

## 2.2. D-glutamato:cloro – D-Glu:Cl

Los aminoácidos son componentes básicos de las proteínas, desde formar parte estructural en las mismas, hasta ser los residuos catalíticos en las enzimas. También pueden desempeñar otras funciones como neurotransmisores en algunos organismos como el ser humano y ser componentes esenciales en la estructura de la pared celular de las bacterias. Entre el grupo diverso de éstas moléculas, se encuentra el ácido glutámico (Glu, C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>), el cual desempeña un papel clave y vital como componente de enzimas como la VpGluR, así como sustrato de la misma (Tate & Meister, 1981*a,b*). A pesar de que el ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) se carga con L-Glu's exclusivamente para la formación de proteínas y enzimas, el isómero D-Glu es esencial para la formación de la pared celular tanto de bacterias gram positivas como negativas, ya que sin éste no se puede formar el oligopéptido que permitirá el entrecruzamiento y formación del peptidoglucano (Vollmer *et al.*, 2008; Silhavy *et al.*, 2010).

En este sentido, el papel de éste aminoácido se extiende más allá de ser un componente de proteínas, también llega a fungir como inhibidor de la ruta metabólica del glutatión (Deneke & Fanburg, 1989) y como una molécula excitadora neuronal en mamíferos (Jilek & Kreil, 2008). Por otra parte, en plantas se involucra como molécula de señalización para la comunicación de las mismas (Andel, 1966). Además de presentar otros usos aplicados en laboratorio como la formación de sintones *in vitro* en la ingeniería de cristales (Tilborg *et al.*, 2014); así como en la obtención de nuevos materiales con propiedades ópticas no lineales (NLO) (Jiang & Fang, 1999).

Es por ello que conocer y determinar correctamente la configuración absoluta (distinguir entre los isómeros L-Glu y D-Glu) es de suma importancia en química, farmacia y ciencias de los materiales. Esto resulta posible a través de la técnica de difracción de rayos X de cristales únicos de dicha molécula, mediante el parámetro físico-matemático de Flack:

$$|F(\mathbf{h},x)|^2 = (1-x)|F(\mathbf{h})|^2 + x|F(-\mathbf{h})|^2$$

Este parámetro es capaz de distinguir entre formas del enantiómero L o D (Flack, 1983), siendo fundamental en el diseño de fármacos y medicamentos para uso humano, ya que una mala designación de la configuración absoluta puede traer graves consecuencias para la salud humana y animales (Barrow *et al.*, 1969; Papaseit *et al.*, 2013; Zlotos *et al.*, 2019; Kee *et al.*, 2019). Es por ello que conocer y determinar la configuración absoluta de compuestos quirales es relevante para el diseño de fármacos e inhibidores para moléculas blanco como VpGluR.

### 2.3. Glutarredoxina 2 – VpGrx2

Las glutarredoxinas (Grx) son proteínas oxidoreductasas pequeñas (9-15 kDa) ubicuas que pertenecen a la superfamilia de las tiorredoxinas (Martin, 1995), siendo éstas las que usan el glutatión (GSH) como donador de electrones para cumplir su función principal: mantener el estado reducido de los residuos de cisteína en proteínas intracelulares (Fernandes & Holmgren, 2004).

Cuando se produce un desequilibrio redox debido a un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) o especies reactivas de nitrógeno (RNS), las cisteínas de las proteínas pueden oxidarse y perder su función. Debido a lo anterior, Grx junto con GSH y las tiorredoxinas (Trx) proporcionan un mecanismo redox regulador de defensa esencial para que la célula mantenga el estado reducido de proteínas intracelulares, tanto en condiciones normales como en estrés oxidativo (Stroeher & Millar, 2012).

Las Grxs son un grupo de proteínas versátiles, ya que llevan a cabo diversas funciones tales como: la activación del factor de transcripción de la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B, la modulación del estado redox de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la activación de enzimas como la creatina cinasa, la tirosina fosfatasa y la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana (Lillig *et al.*, 2008; Lillig & Berndt, 2013). Estas proteínas redox también participan en procesos esenciales como la regulación de la diferenciación celular, la transcripción y la apoptosis; además, pueden funcionar como chaperonas para facilitar el plegamiento de proteínas (Berndt *et al.*, 2008). Las Grxs desempeñan dichas funciones por medio de la S-glutationilación reversible de proteínas, utilizando el poder reductor de las cisteínas (Cys) en el sitio activo, siendo la Cys del extremo N-terminal esencial para la función de glutathionilación (Dalle-Donne *et al.*, 2009).

En los últimos años, las Grxs se han relacionado con la biogénesis de los grupos de hierro [2Fe-2S] que participan en la regulación/homeostasis del hierro intracelular (Fontecave, 2006; Grek *et al.*, 2013). La S-glutationilación es una modificación post-traducciona l de proteínas que puede regular los factores de virulencia de patógenos acuáticos como en *Vibrio vulnificus*, permitiendo que la bacteria sobreviva al estrés oxidativo, regule su homeostasis de hierro y active las vías de síntesis de proteínas durante el proceso de infección (Lim & Choi, 2014). Todas estas funciones son posibles debido a la presencia de varias glutarredoxinas en la célula, que varían en tamaño y en su motivo conservado donde se lleva a cabo la actividad redox (Holmgren, 1988; Holmgren & Aslund, 1995). Las glutarredoxinas monotiólicas son un grupo de enzimas que presentan un solo residuo de Cys en el extremo N-terminal de su sitio activo en organismos desde eucariotas como *S. cerevisiae*, plantas y humanos (Herrero & Torre-Ruiz, 2007; Lillig *et al.*, 2008; Mühlenhoff *et al.*, 2010), hasta procariotas como *E. coli* con su glutarredoxina 2 (Ye *et al.*, 2014). La Grx2 de *E. coli* es una proteína híbrida con dos funciones diferentes, siendo su actividad principal la función redox o antioxidante y una función secundaria como enzima tipo glutatión S-transferasa (GST);

por lo que las Grxs son moléculas esenciales para la defensa de organismos patógenos como *V. parahaemolyticus*.

Por todo lo anterior, el estudio de proteínas clave en el desarrollo y defensa de *V. parahaemolyticus* como VpGluR y su sustrato D-Glu así como la proteína redox VpGrx2, permitirá desarrollar las bases para el entendimiento y comprensión de moléculas blanco; lo cual sienta las bases para el desarrollo futuro de inhibidores específicos que propicien la disminución de los patógenos y enfermedades presentes en los cultivos de camarón blanco. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue estudiar y caracterizar a dichas proteínas blanco con un enfoque bioquímico y estructural.

### 3. HIPÓTESIS

Las moléculas blanco esenciales en el desarrollo de *V. parahaemolyticus*: VpGluR, D-Glu y VpGrx2, son susceptibles de caracterizar bioquímica y estructuralmente mediante el repliegamiento *in vitro* de la enzima VpGluR, la determinación de la configuración absoluta a temperatura ambiente de su sustrato D-Glu y la caracterización bioquímica de la VpGrx2 como proteína tipo redox así como transferasa.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Caracterizar bioquímica y estructuralmente tres moléculas esenciales en el desarrollo de *V. parahaemolyticus*: VpGluR, D-Glu y VpGrx2.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Sobreexpresar y purificar de manera recombinante las proteínas VpGluR y VpGrx2.
2. Establecer la estructura y modelo 3D de VpGluR y VpGrx2
3. Determinar la actividad enzimática de VpGluR y VpGrx2
4. Obtener la estructura del D-Glu y determinar su configuración absoluta.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. VpGluR

#### 5.1.1. Sobreexpresión Heteróloga de VpGluR

Se descongeló un vial con 50  $\mu$ l de bacterias *E. coli* cepa BL21(DE3)-GOLD quimio-competentes con cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Howland, 1996). Se le agregaron 2  $\mu$ l de ADN plasmídico (ADNp) correspondientes a 20 ng del constructo comercial de VpGluR (pJ Express 415, DNA 2.0), se mezcló e incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se realizó el choque térmico en baño maría a 42 °C durante 30 seg, enseguida se colocó nuevamente el vial en hielo por 2 min. Una vez realizada la transformación se transfirió el total del volumen a un nuevo vial estéril de 2 ml y se agregaron 250  $\mu$ l de medio SOC (Ver Apéndice A – Capítulo 1) (Howland, 1996; Coligan, 2003) a temperatura ambiente y se incubó el vial a 37 °C durante 1 – 3 h en agitación constante a 220 rpm.

Finalmente, el volumen total ( $\approx 300$   $\mu$ l) se utilizó para sembrar en tres placas Petri (150, 100 y 50  $\mu$ l respectivamente) con agar LB (Sargent, 2004) adicionadas con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, antibiótico correspondiente a la resistencia presente en el vector de expresión donde se encuentra clonada la región codificante de VpGluR. Una vez realizada la siembra, se incubaron las placas a 37 °C durante 16 – 18 h. A partir de una colonia individual, se sembró en un tubo de ensayo con 5 ml de medio líquido Luria-Bertani (LB) (Bertani, 1951; Sargent, 2004; Coligan, 2003) adicionado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Enseguida el inóculo se incubó durante 2 – 3 h a 37 °C en agitación a 220 rpm. Posteriormente se transfirió 1 ml a un matraz con 50 ml de medio LB y antibiótico correspondiente (inóculo para sobreexpresión de VpGluR) y se incubó durante 16 – 18 h en las condiciones antes descritas.

El crecimiento bacteriano para la sobreexpresión de VpGluR se inició inoculando los 50 ml de caldo de cultivo del paso anterior en un matraz Fernbach con 1 L de medio LB adicionado con 100

µg/ml de ampicilina. Posteriormente se incubó durante 1 – 3 h a 37 °C en agitación a 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. Una vez alcanzada dicha densidad óptica se inició la sobreexpresión de VpGluR al agregar isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM y se continuó la misma durante 24 h. A continuación, el cultivo se centrifugó durante 10 min a 4 °C y 4000 x g. Finalmente se descartó el sobrenadante y obtuvo la biomasa precipitada, la cual fue lavada con una solución salina al 0.9% de NaCl, centrifugada a 4000 x g y almacenada a -80 °C (García-Orozco *et al.*, 2005; López-Zavala *et al.*, 2014; Carrasco-Miranda *et al.*, 2014).

### **5.1.2. Solubilización y Replegamiento de VpGluR**

Debido a que la proteína se sobreexpresó de manera insoluble (Choi *et al.*, 1991; Kane & Hartley, 1988; Singh *et al.*, 2015), se procedió a solubilizarla de los cuerpos de inclusión mediante compuestos caotrópicos. La biomasa bacteriana obtenida durante la sobreexpresión fue resuspendida en una solución de lisis, en una proporción de 4 ml por cada gramo de biomasa, manteniéndose en baño de hielo durante su lisis. La lisis se llevó a cabo mediante sonicación en un equipo Branson Sonifier® S-450, aplicando pulsos durante 10 s en 6 repeticiones, con pausas de 10 s. Posteriormente se centrifugó la muestra en un rotor SS-34 durante 30 min a 4 °C y 22,000 x g en una centrífuga Sorvall RC-5C plus, se descartó el sobrenadante y se continuó el protocolo con la pastilla o pellet que contiene la proteína de interés.

Seguidamente se resuspendió la pastilla en solución de lavado 1 mediante sonicación en las condiciones antes descritas, en una proporción de 4 ml por cada gramo de biomasa y se centrifugó durante 30 min a 4 °C y 22,000 x g. Una vez realizado lo anterior, se prosiguió a repetir el procedimiento en dos ocasiones utilizando la solución de lavado 2. Finalmente, se resuspendió la pastilla en solución de extracción que contiene urea 8 M, mediante sonicación. En esta etapa el agente caotrópico disuelve las proteínas mediante desnaturalización, la cual se clarifica centrifugando bajo las condiciones mencionadas (García-Orozco *et al.*, 2005; Coligan, 2003). La proteína de interés en este paso se encuentra en la solución y el precipitado o pastilla se descarta.

La solución de VpGluR desnaturalizada fue replegada en dos pasos. En el primero se disminuyó la concentración de urea por dilución y posteriormente a la purificación por IMAC, como segundo paso mediante diálisis. En ambas etapas se utilizó la misma solución de replegamiento. En la primera fase, se diluyó la solución de VpGluR al doble de su volumen, 8 ml a 16 ml en una solución de replegamiento para llevar la concentración de urea de 8 M a 4 M. Esto se realizó en baño de hielo a 10 °C y un flujo de 0.5 ml/min en agitación a 50 rpm, mediante el uso de una bomba peristáltica y un agitador magnético respectivamente. El paso anterior se repitió en igualdad de condiciones, con el volumen de 16 ml a 32 ml para disminuir la concentración de 4 M a 2 M de urea (Coligan, 2003). A continuación, se dializó la proteína contra un volumen de 150 ml de solución de unión (A) durante 2 h y se realizó un recambio del mismo volumen y duración. Posteriormente se dializó la proteína contra un volumen de 20 veces el de la muestra de solución de unión (A) durante 10 h, con la finalidad de retirar los compuestos (glutación, glucosa, EDTA) que afectan la cromatografía de IMAC.

El segundo paso del replegamiento consistió en disminuir la concentración de 2 M a  $\approx$  0 M de urea mediante diálisis. Se colectaron las fracciones de la cromatografía que contenían la proteína (6 – 8 ml) y se dializaron en una membrana de 12 – 14 kDa contra un volumen de 100 ml de solución de replegamiento a 10 °C y agitación a 100 rpm por magnetos. Lo anterior se realizó durante 2 h y posteriormente se hizo un recambio de diálisis con la misma duración (Coligan, 2003). Al final, la proteína fue clarificada por centrifugación durante 30 min a 4 °C y 22,000 x g y se dializó contra un volumen de 100 ml de solución amortiguadora VpGluR en dos ocasiones. Se tomó muestra en cada uno de los pasos del protocolo y se siguió a la proteína en condiciones desnaturalizantes y reductoras por SDS-PAGE al 15% (Laemmli, 1970).

### **5.1.3. Purificación de VpGluR por Cromatografía de Afinidad (IMAC)**

La purificación de VpGluR se realizó en condiciones reductoras y desnaturalizantes por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC), en un sistema Äkta Prime Plus (GE, USA). Como paso previo a la cromatografía, el equipo se ambientó (aprox. 15 ml por solución) con una solución de unión (A) y una solución de elución (B) (Healthcare; Block *et al.*, 2009). De

igual forma se ambientó manualmente una columna de níquel HiTrap Hp (GE, USA) – 5 ml con 2 volúmenes de columna (VC) de solución de unión (A). A continuación, se inyectó al equipo un volumen de 10 ml de la solución de VpGluR a un flujo de 0.5 ml/min, proveniente del replegamiento de los cuerpos de inclusión (parte A), para su purificación y se prosiguió con la cromatografía a un flujo de 1 ml/min durante la elución. La cromatografía se realizó en gradiente con fracciones de 0.5 ml y fueron colectadas aquéllas que se encontraron entre 45% y 65% de solución de elución (B) (pico mayoritario durante la cromatografía), correspondientes a 225 mM y 325 mM de imidazol, respectivamente. Posteriormente se analizaron las fracciones eluidas por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 15% (Laemmli, 1970). Se recomienda realizar una limpieza exhaustiva del sistema cromatográfico a fin de evitar alteraciones en los próximos experimentos.

#### **5.1.4. Determinación de la Estructura Cuaternaria de VpGluR**

Como segundo paso de la purificación, se realizó una cromatografía de exclusión molecular (SEC) o filtración en gel (Laurent & Killander, 1964; Giddings & Mallik, 1966). Dicha cromatografía tuvo como objetivo la purificación final de VpGluR, así como determinar su estructura cuaternaria. El procedimiento se realizó en un sistema cromatográfico Äkta Pure® con una columna para filtración en gel Superdex 75 HR10/300 GL (GE Healthcare), equilibrada con una solución para purificación SEC a un flujo de 0.8 ml/min. Previamente la columna se calibró con distintos marcadores de peso molecular (ribonucleasa A – 13700 Da, anhidrasa carbónica – 29000 Da, ovoalbúmina – 44000 Da, conalbúmina – 75000 Da) en la misma solución. Finalmente se inyectó un volumen de 500 µl de muestra de VpGluR ambientada y clarificada previamente en solución para purificación SEC a un flujo de 0.7 ml/min y 0.5 ml/min durante la corrida, colectando fracciones de 0.5 ml (Healthcare; Valenzuela-Chavira *et al.*, 2017). Las fracciones colectadas fueron analizadas por SDS-PAGE al 15% (Laemmli, 1970).

### 5.1.5. Actividad Enzimática de VpGluR

El ensayo de actividad enzimática para VpGluR se realizó en un espectrofotómetro Cary® UV-50 con una celda de cuarzo de 1 ml. El ensayo mide la conversión del enantiómero D-glutamato (D-Glu) a L-glutamato (L-Glu) por medio de una reacción acoplada, donde la enzima L-Glutamato deshidrogenasa (L-GDH) E.C. 1.4.1.2, es dependiente de sustrato y específica para L-Glu. La actividad se monitoreó a través de la medición del incremento de NADH debido a la reducción del NAD<sup>+</sup> por efecto de la L-DGH), como un reflejo en el aumento de la absorbancia a 340 nm (Hald *et al.*, 1975; Ziegenhorn *et al.*, 1976). La enzima acoplada LDGH se disolvió en una solución amortiguadora LDGH previo al experimento y se mantuvo en condiciones de baja temperatura en baño de hielo (Lundqvist *et al.*, 2007). Posteriormente, el cofactor NAD<sup>+</sup> fue disuelto en la solución de actividad enzimática, junto con el sustrato D-Glu a una concentración de 21 mM. La concentración final de la enzima LDGH fue de 15 U/ml y 1 μM para la VpGluR en un volumen final de 1 mL a pH 8.0 (Gallo *et al.*, 1993a; Lundqvist *et al.*, 2007; May *et al.*, 2007; Mehboob *et al.*, 2009; Böhmer *et al.*, 2013).

### 5.1.6. Experimentos de Difracción, Rayos-X y Colecta de Datos

Se realizó un escrutinio de las condiciones de cristalización de la glutamato racemasa recombinante de *V. parahaemolyticus* utilizando juegos de reactivos comerciales Crystal Screen I e Index de Hampton Research por el método de microlote (microbatch) en placas Greiner. Los experimentos de cristalización consistieron en colocar y mezclar un volumen de 1 μl de VpGluR a 4 mg/ml en forma apo y otro de igual volumen de las soluciones de ambos *kits* (soluciones de cristalización = 50) por cada pocillo de la placa. Se obtuvo una concentración final de 2 mg/ml de la proteína. Dicha solución fue cubierta con 10 μl de aceite de parafina y las placas se incubaron a 289 K durante 1 – 2 meses, observando su avance cada semana hasta la formación de los cristales (López-Zavala *et al.*, 2013, 2014; Carrasco-Miranda *et al.*, 2014).

### 5.1.7. Modelo Estructural 3D *in silico* de VpGluR

Se construyó un modelo 3D *in silico* de la VpGluR a través de la suite de herramientas bioinformáticas y servidor Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009; Kelley *et al.*, 2015), utilizando como base la secuencia de la proteína con la cual se alimentó el servidor para la creación del mismo. Se utilizó el protocolo ‘normal’ del servidor Phyre2 para la obtención del modelo estructural. Dicho modelo se visualizó y editó en el software PyMol versión 1.7.2.3 (Schrödinger, LLC, 2015a).

## 5.2. D-Glu:Cl

### 5.2.1. Síntesis y Cristalización de D-Glu:Cl

Para la cristalización del compuesto ácido D-glutámico:cloro (D-Glu:Cl) se utilizaron los siguientes reactivos: cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ , Sigma C1016) y ácido D-glutámico (D-Glu, Sigma G1001,  $\geq 99\%$  de pureza) del fabricante Sigma-Aldrich (Toluca, México) sin purificación o recristalización previa. Se preparó una solución equimolar de 50 mmol de D-Glu + 50 mmol de  $\text{CaCl}_2$ , en volumen final de 1 ml de agua ultrapura Milli-Q (Merck Millipore, México). Posteriormente, se disolvieron ambos reactivos por agitación suave hasta formar una solución homogénea y una vez disueltos, se aforó el volumen a 1 ml. A continuación, la solución (D-Glu+ $\text{CaCl}_2$ ) se vertió en un vial de vidrio de 5 ml con tapa de rosca, cerrada hasta la mitad para permitir la evaporación. Enseguida, los viales se dejaron reposar a 298 K (25 °C) en una superficie plana y se monitoreó la formación de cristales durante la evaporación durante las siguientes semanas. Al término de 4 semanas Se obtuvieron los cristales de D-Glu+ $\text{CaCl}_2$ .

### 5.2.2. Difracción de Rayos-X de Monocristal de D-Glu:Cl

Para la difracción de rayos-X de D-Glu:Cl se utilizó un difractómetro Bruker D8 QUEST equipado con un monocromador de espejos de múltiples capas y un tubo sellado de microfoco de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ ). Las imágenes (frames) para generar el patrón de difracción se recolectaron a  $T = 300(2) \text{ K}$  mediante exploraciones en los ángulos de rotación  $\omega/\varphi$  del goniómetro y cristal respectivamente. Concluido el experimento de difracción, se prosiguió a reducir las intensidades obtenidas en el patrón de difracción a  $F^2$  (factores estructurales) y se corrigieron para su absorción con el software SADABS (SAINT-NT) (Bruker, 2014). Posteriormente, se obtuvo la solución por medio de SHELXT V2014/4 (Sheldrick, 2008, 2015) y se realizó el refinamiento de los datos y  $F^2$  mediante los programas SHELXL-2014/7 dentro de la paquetería de software WinGX (Farrugia, 2012). Enseguida, se realizó el refinamiento para los átomos que no fueran hidrógenos de manera anisotrópica (parámetro térmico de la vibración atómica) (Rupp, 2009). Los átomos de hidrógeno en CH y CH<sub>2</sub> se colocaron en posiciones geoméricamente calculadas utilizando los modelos HFIX 13 y HFIX 23, respectivamente; mientras que los átomos de hidrógeno en O1H1 fueron idealizados como grupos funcionales OH y los presentes en C1-O1-H1 con un ángulo tetrahédrico. Por otro lado, los átomos de hidrógeno envueltos en la interacción de 'X-H...Cl' (NH<sub>3</sub> y O4H4) fueron posicionados a través de un examen iterativo de los mapas de las diferencias de Fourier, seguido de un refinamiento por mínimos cuadrados  $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{eq}}(\text{N})$  and  $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.5U_{\text{eq}}(\text{O4})$ . La estructura cristalina fue analizada mediante los programas Platon (Spek, 2003, 2009), Ortep para Windows (Farrugia, 2012) y Mercury 3.1 (Macrae *et al.*, 2008). Finalmente, los datos cristalográficos de la estructura cristalina del ácido D-glutámico:cloruro (D-Glu:Cl) se depositaron en el Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) con número de identificación: CCDC-1515166.

### 5.2.3. Configuración absoluta de D-Glu:Cl y validación del modelo

Con los datos cristalográficos de la estructura de D-Glu:Cl dilucidada se prosiguió a analizar, asignar y validar la configuración absoluta del mismo. Lo primero que se realizó fue un

refinamiento de la estructura por medio del método de mínimos cuadrados de matriz completa (*Full-matrix least squares*) sobre  $F^2$ . Posteriormente se analizó el resultado con el modelo estadístico bondad de ajuste (Goodness-on-fit), para descartar o aceptar si el modelo estructural obtenido es el adecuado, es decir, que existe coherencia entre los datos obtenidos y la estructura cristalina real, para continuar con los siguientes análisis estadísticos; a lo anterior se le aplicó un análisis de D-Glu:Cl presumiendo una estructura tipo (R) y otra como tipo (S). Enseguida, previo a la determinación de la configuración absoluta (R o S) se analizaron los parámetros de buena calidad (R') R1 y wR2 (Hooft *et al.*, 2008), para continuar con la determinación de la configuración absoluta del compuesto de interés. Posteriormente, se corroboraron los valores obtenidos en el rango de  $2\theta$ , con los cuales se comprueba si hubo una correcta dispersión de los rayos-X (Hooft *et al.*, 2008). Finalmente, para la determinación y asignación de la configuración absoluta de D-Glu:Cl, se analizaron los distintos modelos estadísticos: Flack (X), Parsons (Z), Hooft (y) y Hooft (G) (Flack, 1983; Spek, 2003; Hooft *et al.*, 2008; Murakami *et al.*, 2010; Parsons *et al.*, 2013), obteniéndose para cada uno sus valores e incertidumbres estándar estimadas (esd o su).

La verificación de la validez de los datos se llevó a cabo a través de un análisis estadístico tipo *t*-Student, para conocer si la asignación de la configuración absoluta (R o S) de D-Glu:Cl fue la correcta. También se analizaron los pares de Bijvoet obtenidos del refinamiento de la estructura, para conocer si fue posible asignar los datos obtenidos (intensidades) a alguna de las configuraciones absolutas de la estructura, ya sea en D-Glu:Cl (R) o D-Glu:Cl (S). Finalmente se realizó una prueba estadística Bayesiana, donde se analizaron distintas hipótesis sobre la asignación de la configuración absoluta, en dos vías (P2 – correcto, P2 – incorrecto) o tres vías (P3 – correcto, P3 – gemelo racémico, P3 – incorrecto) (Hooft *et al.*, 2008).

### 5.3. VpGrx2

#### 5.3.1. Preparación del ADN plasmídico (ADNp) de VpGrx2

Se obtuvo la secuencia de ADN de una Glutarredoxina tipo 2 (VpGrx2) del genoma de *Vibrio*

*parahaemolyticus* FIM-S1392(-) (GenBank JPLU00000000.1) (Gomez-Jimenez *et al.*, 2014), predicha y anotada funcionalmente mediante MyRAST (Aziz *et al.*, 2008; Overbeek *et al.*, 2014). Dicha secuencia se utilizó para el diseño y síntesis de un gBlock (ADN de doble cadena lineal) con los codones optimizados (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) para su uso en *E. coli*, mediante el servicio en línea de Integrated DNA Technologies (IDT, <https://www.idtdna.com/CodonOpt>). El gBlock (500 ng) liofilizado se centrifugó durante 5 s a 100 x g para concentrar el material al fondo del tubo y se resuspendió en 50 µl de solución amortiguadora TE pH 8.0. Posteriormente se homogenizó la solución por agitación en vortex durante 1 – 2 s y se incubó a 50 °C durante 20 min para asegurar la total resuspensión del ADN. A continuación, la solución se homogenizó nuevamente en vortex durante 1 – 2 s y se centrifugó por 5 s a 100 x g. Finalmente, se obtuvo una solución del gBlock a 10 ng/µl (Integrated DNA Technologies; Valenzuela-Chavira, 2018).

5.3.1.1. Ligación del gBlock de VpGrx2 en el vector de clonación pJET1.2/blunt. Una vez preparado el gBlock, se procedió a la ligación del mismo en un vector de clonación pJET1.2/blunt mediante el juego de reactivos comercial CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher Scientific). La reacción de ligación se realizó en un vial donde se mezclaron: 5 µl de solución de reacción 2X, 3 µl (30 ng) de gBlock, 0.5 µl (25 ng) de DNAp pJET1.2/blunt, 0.5 µl (2.5 U) de T4 DNA Ligasa (ThermoFisher Scientific) y 1 µl de agua estéril libre de nucleasas para un volumen final de 10 µl. La solución se mantuvo en hielo hasta terminar de agregar cada componente. Finalmente se incubó la reacción durante 15 min a 25 °C; una vez concluido lo anterior se regresó la solución al hielo y se mantuvo en éste para posteriores experimentos.

5.3.1.2. Obtención del ADNp (pJET1.2/blunt-gBlock) de VpGrx2. Una vez realizada la ligación del constructo en el vector, se prosiguió a la transformación de bacterias *E. coli* One Shot™ TOP 10 (ThermoFisher Scientific) quimio-competentes con CaCl<sub>2</sub>. Se descongeló un vial con 50 µl de bacterias TOP 10 en un recipiente con hielo (5 – 7 min) (Howland, 1996) y se agregaron 5 µl de ADN plasmídico linearizado (pJET1.2/blunt-gBlock) de la solución de ligación. Dicha mezcla se homogenizó suavemente por inversión 3 veces y se incubó durante 30 min en hielo. A continuación, se dió un choque térmico a 42 °C durante 30 s en baño maría y se regresó el vial al hielo durante 2 min; enseguida, se agregaron 250 µl de medio SOC estéril (apéndice A) y se incubó

el vial durante 1 – 2 h a 37 °C en agitación constante a 220 rpm (Howland, 1996; Coligan, 2003).

La solución de transformación ( $\approx 300 \mu\text{l}$ ) se distribuyó en tres cajas Petri con agar LB adicionadas con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina en volúmenes de 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  y 150  $\mu\text{l}$ , respectivamente. Las placas se incubaron durante 16 – 18 h a 37 °C. Culinado el período de incubación, se seleccionó una colonia individual y se inoculó en un tubo de ensayo con 5 ml de medio líquido LB adicionado con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina y se incubó durante 2 – 3 h a 37 °C en agitación a 220 rpm. Una vez concluido el tiempo de incubación, el cultivo se centrifugó durante 5 min por cada 1 ml de cultivo a 25 °C y 4000 x g (García-Orozco *et al.*, 2005; Valenzuela-Chavira *et al.*, 2017). La biomasa obtenida se utilizó para la extracción de ADN plasmídico (pJET1.2/blunt-gBlock) según las instrucciones del fabricante, mediante el juego de reactivos comercial GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific). Una vez extraído el ADN plasmídico, se purificó y limpió a partir de un gel de agarosa preparativo al 0.8 %, mediante QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) y se almacenó a -20 °C para futuros experimentos.

5.3.1.3. Digestión del ADNp (pJET1.2/blunt-gBlock) y el vector de expresión pET11a. Para la digestión del ADNp (pJET1.2/blunt-gBlock) obtenido en el paso anterior y el vector de expresión pET11a (DNA 2.0), se utilizaron las enzimas de restricción *BamHI* y *NdeI* (ThermoFisher Scientific). Esto generó extremos cohesivos en ambos fragmentos de ADN necesarios para la ligación direccional del gBlock en el vector de expresión. La digestión se llevó a cabo en un volumen de 30  $\mu\text{l}$ , donde la reacción para cada digestión individual (pJET1.2/blunt-gBlock y pET11a) constó de 3  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora 10X Fast Digest Green Buffer (ThermoFisher Scientific), 1.5  $\mu\text{l}$  de las enzimas *BamHI* (5 U) y *NdeI* (15 U), 10.1  $\mu\text{l}$  de agua estéril libre de nucleasas (ThermoFisher Scientific) y 13.9  $\mu\text{l}$  (3000 ng) de ADNp del vector pJET1.2/blunt-gBlock, 21.4  $\mu\text{l}$  de agua estéril libre de nucleasas (ThermoFisher Scientific) y 2.6  $\mu\text{l}$  (3000 ng) para el vector pET11a. La reacción de digestión se incubó durante 20 min a 37 °C en baño maría y se detuvo incubando la reacción a 65 °C durante 15 min. Finalmente, la reacción se dejó enfriar a 25 °C durante 15 – 20 min y los fragmentos resultantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

5.3.1.4. Ligación del gBlock de VpGrx2 en el vector de expresión pET11a. El inserto de interés (gBlock) y el ADNp (pET11a) se extrajeron, purificaron y limpiaron a partir de gel de agarosa de bajo punto de fusión (0.8 %), mediante el juego de reactivos comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-UP (Promega) según instrucciones del fabricante. Las muestras se concentraron en un ultra desecador (Savant Speedvac) y se prosiguió a realizar la reacción de ligación (pET11a+gBlock) en el mismo vial donde se concentró el inserto de interés. La reacción se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ l, que contenía: 250 ng de gBlock, 2  $\mu$ l de solución de reacción de ligación 5 X (ThermoFisher Scientific), 1  $\mu$ l (5 U) de T4 DNA Ligasa, 2.3  $\mu$ l (50 ng) de vector pET11a y 4.7  $\mu$ l de agua estéril libre de nucleasas (Coligan, 2003; Sargent, 2004). La reacción se incubó durante 12 – 16 h a 4 °C y posteriormente se prosiguió a la transformación del ADNp (pET11a-gBlock) en células quimio-competentes con CaCl<sub>2</sub> de *E. coli*.

5.3.1.5. Obtención del ADNp (pET11a-gBlock) de VpGrx2. Se repitió el protocolo de transformación antes descrito, donde se descongeló un vial con 50  $\mu$ l de células One Shot™ TOP 10 (ThermoFisher Scientific) en una tarja con hielo durante 5 – 7 min (Howland, 1996) y se le agregaron 5  $\mu$ l del ADN plasmídico (pET11a-gBlock), la mezcla se homogenizó suavemente por inversión 3 veces. Dicho vial se incubó en hielo durante 30 min. Se prosiguió a dar un choque térmico a 42 °C por 30 s en baño maría y posteriormente la mezcla se regresó e incubó en hielo durante 2 min. Una vez realizado lo anterior, se agregaron 250  $\mu$ l de medio SOC estéril y se incubó el vial durante 1 – 2 h a 37 °C en agitación a 220 rpm (Howland, 1996; Coligan, 2003).

Una vez terminado lo anterior, se prosiguió al crecimiento y selección de las bacterias transformadas mediante la siembra del volumen del vial ( $\approx$ 300  $\mu$ l) en tres placas Petri con agar LB adicionadas con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina en volúmenes de 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 150  $\mu$ l, respectivamente. Las placas se incubaron durante 16 – 18 h a 37 °C y finalizado este tiempo, se seleccionó y se inoculó una colonia individual en 5 ml de medio líquido LB adicionado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina en un tubo de ensayo. El tubo se incubó durante 2 – 3 h a 37 °C en agitación a 220 rpm y posteriormente se centrifugó durante 5 min a 25 °C y 4000 x g (García-Orozco *et al.*, 2005; Valenzuela-Chavira *et al.*, 2017). Con la biomasa obtenida, se prosiguió a la extracción y purificación del ADNp (pET11a-gBlock) mediante el juego de reactivos comercial GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) y se prosiguió a limpiarlo a partir de gel de

agarosa preparativo (0.8%) mediante el juego de reactivos Wizard SV Gel and PCR Clean-UP (Promega) según instrucciones del fabricante. El ADNp limpio y purificado se almacenó a -20 °C para los próximos experimentos.

### **5.3.2. Sobreexpresión Heteróloga de VpGrx2 en *E. coli***

Para la sobreexpresión de VpGrx2 se descongelaron una alícuota del ADN plasmídico del constructo de expresión VpGrx2 (pET11a-gBlock) y un vial con 50 µl de células quimio-competentes con CaCl<sub>2</sub> de *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) de 5 – 7 min (Howland, 1996). Una vez descongelados, se agregaron y mezclaron suavemente 2 µl (20 ng) de ADN plasmídico al vial de las bacterias *E. coli* y se incubó en hielo durante 30 min; enseguida se dió un choque térmico a 42 °C durante 30 s en baño maría y se regresó inmediatamente el vial al hielo, donde se incubó por 2 min. Posteriormente se agregaron 250 µl de medio SOC estéril (atemperado a ≈25 °C) y se incubó el vial a 37 °C durante 1 – 3 h en agitación a 220 rpm. Una vez realizado lo anterior, se prosiguió a sembrar el volumen total (≈300 µl) en tres placas Petri con agar LB, adicionadas con 100 µg/ml de ampicilina; las placas se incubaron a 37 °C durante 16 – 18 h. Al día siguiente, se iniciaron los experimentos para la sobreexpresión de la proteína de interés.

A partir de una colonia de las placas Petri sembradas previamente se inoculó un tubo de ensayo con 5 ml de medio líquido LB adicionado con el antibiótico correspondiente (100 µg/ml de ampicilina) (Bertani, 1951; Howland, 1996; Coligan, 2003) y se incubó a 37 °C durante 2 – 3 h en agitación a 220 rpm. Posteriormente, se transfirió 1 ml del medio líquido a un matraz con 50 ml del mismo medio y el antibiótico mencionado (inóculo para sobreexpresión de VpGrx2) y se incubó durante 16 – 18 h en las condiciones antes descritas. El total de volumen de medio con crecimiento bacteriano del paso anterior se utilizó para inocular un matraz Fernbach con 1 L de medio LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina y éste se incubó a 37 °C en agitación constante a 220 rpm. Una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0.6, éste se enfrió en baño de hielo durante 10 min para reducir la temperatura a 16 °C e inducir la sobreexpresión de VpGrx2 al agregar 0.1 mM de IPTG, misma que se llevó a cabo durante 4 h a 25 °C y 220 rpm; al terminó de la incubación el cultivo se centrifugó a 4000 x g durante 10 min a 4 °C. Finalmente, la biomasa

bacteriana obtenida se lavó con una solución salina al 0.9 % de NaCl y se almacenó a -80 °C (López-Zavala *et al.*, 2013; Carrasco-Miranda *et al.*, 2014).

### 5.3.3. Purificación de VpGrx2

Para purificar la proteína se resuspendió la biomasa bacteriana obtenida durante la sobreexpresión en una solución de lisis (apéndice B), en una proporción de 4 ml por cada gramo de biomasa manteniéndose en hielo. El rompimiento celular se llevó a cabo por sonicación, aplicando pulsos de 10 s por 6 repeticiones, tomando pausas de 10 s entre cada repetición. Una vez realizada la lisis, se prosiguió a clarificar la muestra por centrifugación a 22000 x g durante 30 min a 4 °C. El paso anterior se repitió dos veces separando la fracción soluble y se volvió a lisar el pellet, descartándose éste último al final. Una vez clarificada la muestra con la proteína de interés, se filtró utilizando un filtro para jeringa de 0.45 µm (Millipore, CA., USA) (García-Orozco *et al.*, 2005).

5.3.3.1. Cromatografía de afinidad (IMAC). Una vez obtenida la proteína en solución a partir de la lisis bacteriana, se prosiguió a realizar su purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC) en un primer paso y por cromatografía de exclusión molecular (SEC) en un segundo paso. Para la cromatografía IMAC, se ambientó el sistema cromatográfico Äkta Prime Plus (GE, USA) previamente, con 15 ml de solución de unión (A) y solución de elución (B) (ver apéndice B; (Vlamiš-Gardikas *et al.*, 1997; Block *et al.*, 2009). De igual manera, se equilibró una columna HiTrap Hp (GE, USA) de 1 ml con 5 volúmenes de columna de la solución de unión (A) antes de llevar cabo la purificación; enseguida, se realizó la cromatografía en gradiente, donde se inyectó un volumen de 10 ml de la solución de VpGrx2 a un flujo de 0.5 ml/min y se continuó a un flujo de 1.0 ml/min durante la elución. Se recolectaron las fracciones que se encontraban entre el 40 – 45 % de solución de elución (B), correspondientes a 200 mM – 225 mM de imidazol, respectivamente. Posteriormente se analizaron las fracciones mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % en condiciones desnaturizantes y reductoras (Laemmli, 1970).

5.3.3.2. Cromatografía por filtración en gel o exclusión molecular (SEC). Para determinar la estructura secundaria de la VpGrx2, después de la cromatografía IMAC se prosiguió a realizar una segunda cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular (SEC) (Laurent & Killander, 1964; Giddings & Mallik, 1966), misma que sirvió para dos propósitos: para obtener la proteína pura y para determinar su estado oligomérico. Se juntaron las fracciones provenientes de IMAC y se dializaron gradualmente contra una solución para purificación SEC (apéndice B) en un volumen de 100 ml por dos recambios de 2 h y uno final de 16 – 18 h durante la noche. Al día siguiente, se ambientó con 15 ml de la misma solución, un sistema cromatográfico Äkta Pure ® donde se llevó a cabo la cromatografía.

La filtración en gel se llevó a cabo con una columna Superdex 75 HR10/300 GL (GE Healthcare), que se equilibró con la solución para purificación SEC a un flujo de 0.8 ml/min y se calibró previamente al experimento con diferentes marcadores de peso molecular (conalbúmina – 75 kDa, ovoalbúmina – 44 kDa, anhidrasa carbónica – 29 kDa, ribonucleasa A – 13.7 kDa y aprotitina – 6.5 kDa) (GE Healthcare) en la misma solución (Coligan, 2003; Valenzuela-Chavira *et al.*, 2017). Como paso previo a la cromatografía, la VpGrx2 proveniente de IMAC y dializada contra solución de purificación SEC se clarificó por centrifugación a 22,000 x g durante 30 min a 4 °C (Coligan, 2003) e inmediatamente se inyectó un volumen de 500 µl de muestra VpGrx2 a un flujo de 0.7 ml/min y durante la corrida se utilizó un flujo de 0.5 ml/min colectándose fracciones de 0.5 ml. Se analizaron las fracciones colectadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Una vez obtenida la proteína pura, se prosiguió con los próximos experimentos.

#### **5.3.4. Actividad Enzimática de VpGrx2**

Las fracciones puras de VpGrx2 provenientes de la filtración en gel se agruparon y se midió la concentración de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA). Esto se realizó mediante el juego de reactivos comercial Pierce-BCA assay kit (ThermoFisher Scientific) según instrucciones del fabricante y se utilizó como estándar albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich).

5.3.4.1. Actividad tipo GRX. El ensayo de actividad glutaredoxina de VpGrx2 se realizó como ensayo específico de  $\beta$ -hidroxietileno disulfuro (HED) (Holmgren & Aslund, 1995). Este método mide la reducción de puentes disulfuro mixtos entre el glutatión (GSH) y el HED en el complejo ( $\beta$ -ME-GS) por efecto de la glutaredoxina. La reacción se acopló a la enzima glutatión reductasa (GR) E.C. 1.8.1.7, la cual es dependiente de glutatión oxidado (GSSG) y utiliza  $\beta$ -Nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) como cofactor, para su función de VpGrx2. El progreso de la reacción se monitoreó por la disminución del NADH por efecto de la GR a 340 nm (Hald et al., 1975; Ziegenhorn et al., 1976). El experimento se llevó a cabo a 25 °C durante 5 min en un espectrofotómetro Cary® UV-50 en una celda de cuarzo de 1 ml en una solución de actividad enzimática tipo GRX (apéndice B), la cual contiene GR a una concentración de 1 mU/ml. Se disolvieron los reactivos NADH y el HED a una concentración de 0.4 mM y 1 mM, respectivamente. Para iniciar la reacción, el último reactivo en agregarse fue la enzima VpGrx2 a una concentración de 1  $\mu$ M en un volumen final de 1 ml a pH 8.0.

5.3.4.2. Actividad tipo GST (híbrida). El ensayo de actividad GST de VpGrx2 se llevó a cabo en base a la técnica descrita por Habig *et al.*, (1974), en un espectrofotómetro Cary® UV-50 en una celda de cuarzo de 1 ml con una solución de actividad enzimática tipo GST (apéndice B) y 1  $\mu$ M de VpGrx2. El ensayo mide la conjugación del glutatión (GSH) con el sustrato modelo 1-cloro-2, 4-dinitrobenceno (CDNB) para formar el compuesto 2,4-dinitrofenil-S-conjugado (GS-DNB) (Galleguillos *et al.*, 2012), el cual absorbe a 340 nm y posee un coeficiente de extinción molar de 9.6 mM/cm. La reacción enzimática se realizó a 25 °C durante 5 min en un volumen final de 1 ml (Habig *et al.*, 1974).

### **5.3.5. Modelo Computacional 3D de VpGrx2**

El modelo predictivo 3D *in silico* de VpGrx2 se obtuvo mediante el servidor y herramientas bioinformáticas Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009; Kelley *et al.*, 2015) utilizando como base la secuencia en aminoácidos de la proteína con la cual se generó el modelo 3D. Dentro del servidor Phyre2, se utilizó el protocolo 'normal' para la creación del modelo estructural y éste se visualizó

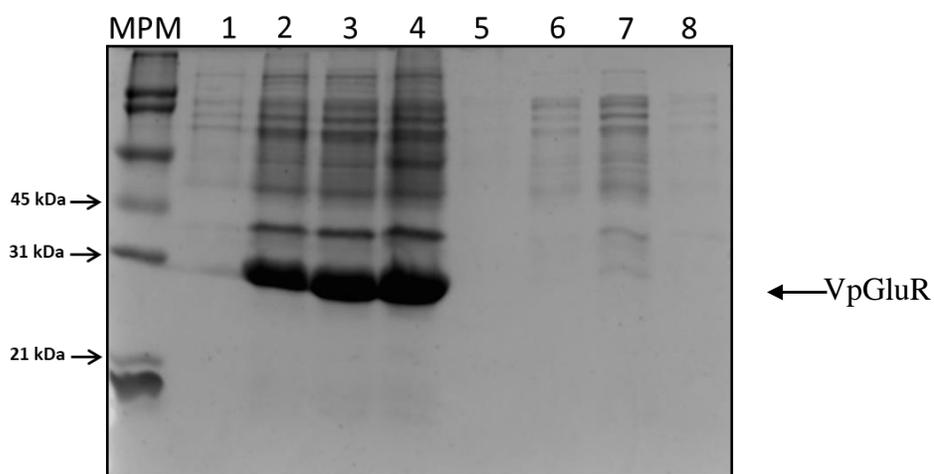
y editó en el software PyMOL versión 1.8 (Schrödinger, LLC, 2015b). El modelo *in silico* 3D obtenido de VpGrx2 a través del servidor Phyre2, se utilizó para alinearlo con una molécula de glutatión reducido (GSH), mediante el software PyMOL versión 1.8 (Schrödinger, LLC, 2015b).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Glutamato racemasa – VpGluR

#### 6.1.1. Sobreexpresión heteróloga de VpGluR

La enzima VpGluR se sobreexpresó de manera insoluble formando cuerpos de inclusión (figura 2), donde se observa el aumento en la intensidad de una banda del tamaño esperado aproximado de 32 kDa en la fracción insoluble (carriles 1 –4,) mientras que en la fracción soluble (carriles 5 – 9) no existe un patrón de sobreexpresión de dicha banda. Los carriles 1- 4 corresponden a los tiempos de 0 a 24 h de expresión, donde es evidente un aumento en la banda del tamaño esperado al transcurrir las horas de sobreexpresión, donde dicho aumento se da tanto en comparación con el tiempo anterior, es mayor la intensidad de la banda a las 2 h que a las 0 h, a las 6 h que a las 4 h, sucesivamente hasta las 24 h de sobreexpresión, así como con respecto a las bandas de otras proteínas en el tiempo analizado; esto es, la banda de interés en el carril 4 (24 h) es más intensa que las otras bandas del mismo carril.



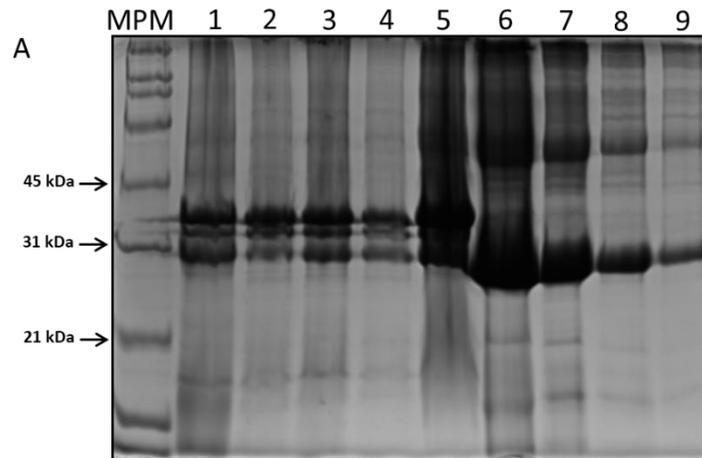
**Figura 2.** Cinética de sobreexpresión de VpGluR. Marcador de peso molecular Broad Range (MPM-izq.). Carriles 1-4 corresponden a los tiempos de expresión 0, 4, 6 y 24 h de la fracción insoluble respectivamente. Fracción soluble de la sobreexpresión de 0, 4, 6 y 24 h se muestran en los carriles 5-8. El patrón de bandeado muestra un aumento en la banda con el tamaño esperado de 32 kDa en la fracción insoluble, por lo que la proteína de interés se expresó en cuerpos de inclusión.

La formación de los cuerpos de inclusión en la expresión de proteínas recombinantes no es deseable, ya que ésto puede retrasar la obtención de las mismas, tanto en la investigación científica o farmacéutica (Baneyx & Mujacic, 2004). Por lo anterior, se han diseñado y propuesto diversas estrategias para evitar su formación (Ramón *et al.*, 2014), dentro de las que se incluyen la co-expresión de proteínas de interés en conjunto con proteínas chaperonas, como GroES y GroEL, la aplicación de métodos físicos, como la disminución de la temperatura del cultivo de 37 °C a 16 °C, así como la reducción de la expresión génica durante el experimento de sobreexpresión, a través del uso de un sistema con una regulación más estricta para la expresión del gen de interés, como una cepa pLysS por ejemplo (Baneyx & Mujacic, 2004; Lee *et al.*, 2005; Sørensen & Mortensen, 2005; Rinas *et al.*, 2017), entre otras. Uno de los aspectos más relevantes que han adquirido los cuerpos de inclusión en los últimos años, especialmente en la industria farmacéutica y biotecnológica, es que éstos pueden ser una fuente casi pura de la proteína de interés, facilitando su obtención (Ramón *et al.*, 2014; Rinas *et al.*, 2017). En este sentido, un ejemplo práctico es la producción de insulina para uso médico, que se obtiene a través de los cuerpos de inclusión, los cuales son solubilizados y replegados posteriormente de manera *in-vitro* (Nilsson *et al.*, 1996; Ramón *et al.*, 2014). Basados en este principio se prosiguió con la expresión heteróloga de VpGluR, la cual se llevó a cabo durante 24 h para favorecer la obtención de una mayor cantidad de biomasa bacteriana.

### **6.1.2. Replegamiento *in vitro* de VpGluR**

La solubilización de los cuerpos de inclusión de VpGluR se llevó a cabo mediante un agente caotrópico como la urea, con la finalidad de obtener la proteína de manera soluble, para posteriormente realizar el replegamiento y purificación de la misma en pasos alternados. En la figura 3 (carriles 1 – 5), se observa el proceso de extracción de los cuerpos de inclusión de VpGluR a partir de la lisis bacteriana (carril 1) y la posterior solubilización de los mismos mediante una alta concentración de urea (8 M). Mientras que, en los carriles 6 a 9 se muestra el proceso de replegamiento *in vitro* de VpGluR; en el cual se disminuyó gradualmente la concentración del agente caotrópico (8 M hasta ~ 2 M). La intensidad de la banda del tamaño esperado disminuyó durante el experimento, como se observa al comparar la presencia de dicha banda en los carriles 7-

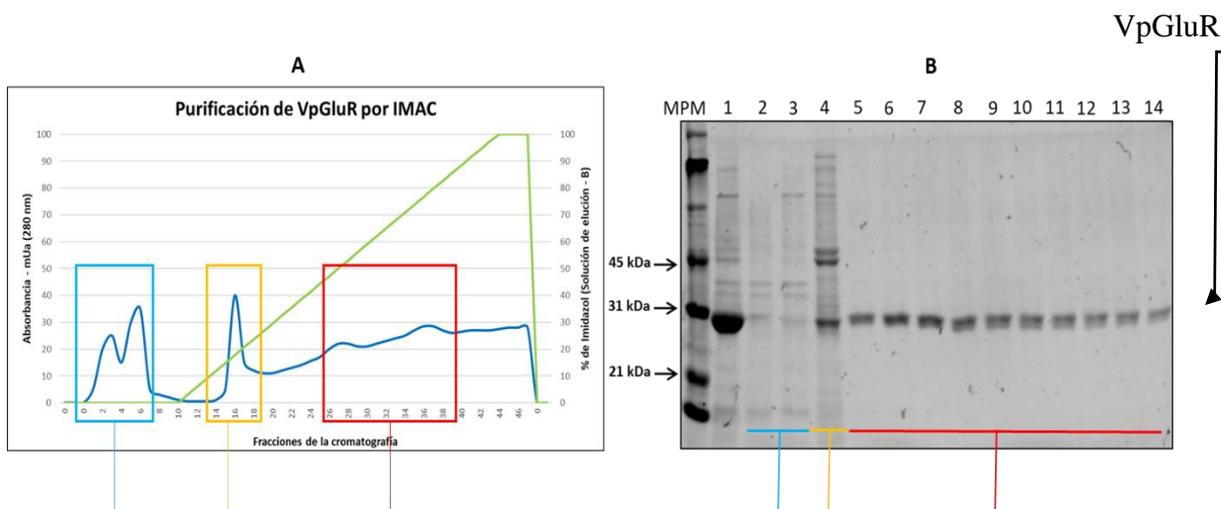
9 con el carril 8. Lo anterior puede deberse a que la mayoría de la VpGluR se logró replegar efectivamente, sin embargo, una fracción de la proteína se precipitó durante el experimento; obteniéndose 4 mg/ml de proteína pura soluble.



**Figura 3.** Tratamiento y disolución de los cuerpos de inclusión de VpGluR para replegamiento *in vitro*. Marcador de peso molecular Broad Range (MPM). Biomasa bacteriana (pellet) lisada por sonicación (carril 1), lavados 1, 2-1, 2-2 y 3 de los cuerpos de inclusión (carriles 2-5), replegamiento *in vitro* disminuyendo la concentración de urea desde 8, 6, 4, 2 M (carriles 6-9).

### 6.1.3. Purificación de VpGluR por cromatografía de afinidad y exclusión molecular

6.1.3.1. Purificación de VpGluR por IMAC. Una vez realizada la solubilización y la primera fase del replegamiento de VpGluR, se prosiguió a su purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC). Dicha cromatografía se muestra en la figura 4-A, donde se observan distintos picos durante la purificación. Los primeros dos picos (cuadro azul) corresponden a las proteínas no unidas durante la purificación. En el segundo pico (cuadro amarillo) se obtuvieron todas aquellas proteínas que se unieron de manera inespecífica a la columna y no son de interés. En el tercer cuadro (rojo) del cromatograma, se resaltan los picos donde eluyó la proteína de interés entre el 30 y 35 % de la solución de elución (B), lo que corresponde de 150 a 175 mM de imidazol. El hecho de que se haya obtenido la banda del tamaño esperado en estos porcentajes de imidazol, significa que ésta cromatografía como un primer paso de purificación fue efectiva. Lo que concedió continuar con los siguientes experimentos.

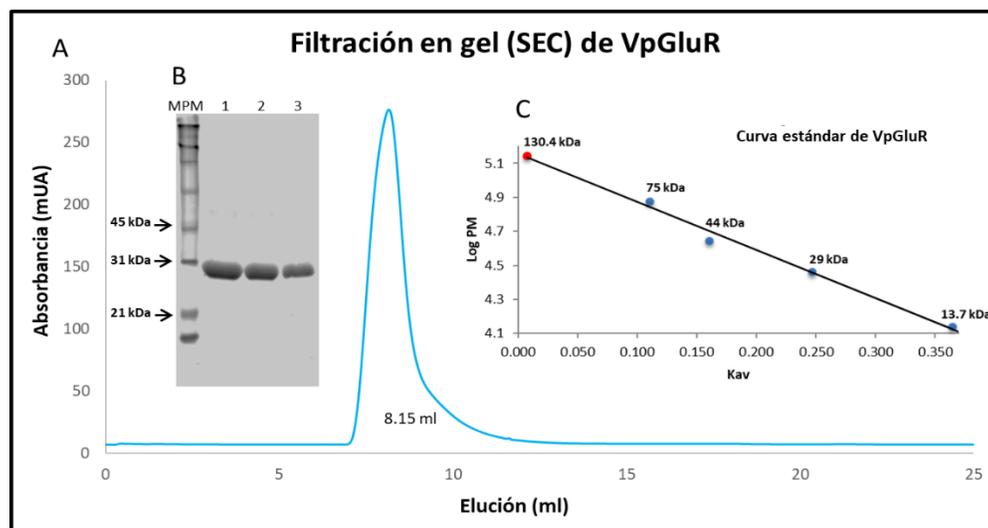


**Figura 4.** Purificación de VpGluR por IMAC. Cromatograma (A), fracciones 1-8: No unido (UN), 14-18: uniones inespecíficas (UNE), 27-30 (30 % B) y 35-40 (35 % B): proteína del tamaño aproximado (32 kDa) VpGluR. Electroforesis en gel (SDS-PAGE 12%) de las fracciones cromatográficas (B). MPM Broad Range, muestra inyectada (carril 1), proteína no unida (carriles 2-3), uniones inespecíficas (carril 4), fracciones VpGluR eluida entre 30-35 % B (150-175 mM imidazol) (carriles 5-14).

Las fracciones de la cromatografía fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 4-B), donde se observó el patrón de bandeo de la misma y se advirtió una banda del tamaño esperado en las fracciones de la elución al 30 – 35 % B como lo muestra el cromatograma (figura 4-A); dichas fracciones no se encontraron totalmente puras, ya que se observaron otras bandas de menor intensidad en las fracciones correspondientes a la elución de VpGluR. Por tal motivo fue necesario realizar una segunda purificación mediante filtración en gel, donde se colectaron las fracciones correspondientes a la elución de VpGluR durante el IMAC y se prosiguió con la segunda fase del replegamiento que consistió en disminuir paulatinamente la concentración de urea (2 M hasta ~ 0 M). El replegamiento *in vitro* se realizó bajo un enfoque ‘step-wise approach’ o gradual a baja temperatura (~ 10 °C), lo que permitió el replegamiento progresivo y gradual de la proteína de interés (Tsumoto *et al.*, 2003; Yuasa *et al.*, 2014; Yamaguchi & Miyazaki, 2014).

6.1.3.2. Purificación de VpGluR por filtración en gel y determinación de su estructura cuaternaria. Después de la purificación y replegamiento de VpGluR, se realizó un segundo paso de purificación para limpiar de impurezas la proteína de interés, obteniéndose así la VpGluR de forma pura. La cromatografía de exclusión molecular también permitió determinar el estado oligomérico de VpGluR. La proteína de interés posee un tamaño de 32.6 kDa y eluyó en un volumen de 8.15 ml (Figura 5-A) correspondiente a un coeficiente de distribución ( $K_{av}$ ) de 0.008. En la figura 5-B se

muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones de la cromatografía, donde se observa la presencia de una banda del tamaño esperado aproximado de VpGluR de 32.6 kDa sin proteínas contaminantes. Con el valor de  $K_{av}$  y mediante la curva estándar para la filtración en gel (Figura 5-C) (Valenzuela-Chavira *et al.*, 2017; Kasaai, 2018) se obtuvo un peso molecular de 130.4 kDa, equivalente a cuatro moléculas, constituyendo el estado oligomérico de la proteína purificada. Es posible que lo anterior se deba a que VpGluR se presenta en un estado oligomérico como tetramero o como un dímero de dímeros. Cabe resaltar que actualmente no existen estudios sobre el estado oligomérico de éstas enzimas (Fisher, 2008; Whalen *et al.*, 2010; Conti *et al.*, 2011).

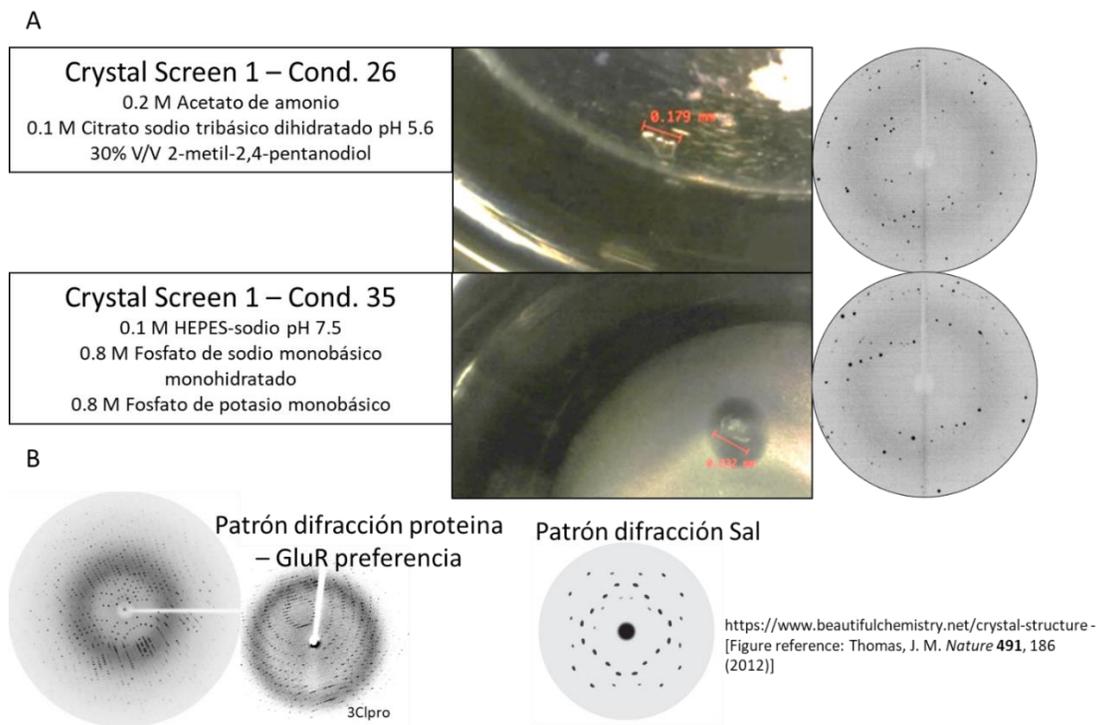


**Figura 5.** Purificación de VpGluR por SEC. Cromatograma (A): proteína pura eluida a 8.15 ml de retención en las fracciones 1, 2, y 3. Electroforesis en gel (SDS-PAGE 12%) de las fracciones cromatográficas (B): MPM Broad Range, fracciones de la proteína pura del tamaño aproximado a (32 kDa) VpGluR (carriles 1, 2 y 3). Curva estándar de VpGluR (C): Valor  $K_{av}$  (0.008) de VpGluR (punto rojo), calculando un tamaño aproximado de 130.4 kDa, equivalente a un tetramero.

Existen diversos estudios en los que se ha dilucidado la estructura de racemasas mediante cristalografía y difracción de rayos-X. Algunas de estas enzimas poseen una estructura terciaria monomérica, como las GluRs de *E. coli*, *L. fermenti* y *B. bifidum* (Gallo & Knowles, 1993; Lee *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Lundqvist *et al.*, 2007), mientras que otras presentan una estructura cuaternaria dimérica como las GluRs de *B. anthracis*, *H. pylori* y *B. cenocepacia* (Lundqvist *et al.*, 2007; Israyilova *et al.*, 2016). Es por ello que VpGluR puede presentar una estructura terciaria o cuaternaria, no obstante, el experimento de filtración en gel indica que probablemente ésta se haya agregado o esté formando dímeros. Para comprobar y conocer la estructura de VpGluR se prosiguió a su cristalización y difracción por rayos X.

#### 6.1.4. Cristalización de VpGluR

Una vez que se obtuvo la enzima VpGluR pura y replegada *in vitro* se formaron los cristales bajo condiciones específicas. Los experimentos de cristalización se llevaron a cabo con una concentración final de 10 mg/ml de VpGluR dando como resultado (Jancarik & Kim, 1991) cristales presumiblemente de proteína. De las condiciones analizadas, solamente dos presentaron la formación de cristales (Figura 6-A, izquierda), la Crystal Screen I – No. 26 (acetato de amonio 0.2 M, citrato de sodio tribásico dihidratado 0.1 M pH 5.6 y 2-metil-2,4-pentanodiol 30 %) y la Crystal Screen I – No. 35 (HEPES sodio 0.1 M pH 7.5, fosfato de sodio monobásico monohidratado 0.8 M y fosfato de potasio monobásico 0.8 M). Dichos cristales crecieron en aproximadamente 2 – 3 semanas posteriores al inicio del experimento, hasta alcanzar un tamaño aproximado de 0.1 x 0.179 x 0.05 mm y 0.11 x 0.132 x 0.04 mm respectivamente. Ambos cristales se utilizaron en los experimentos de difracción, como se advierte en la figura 6-A, parte central.

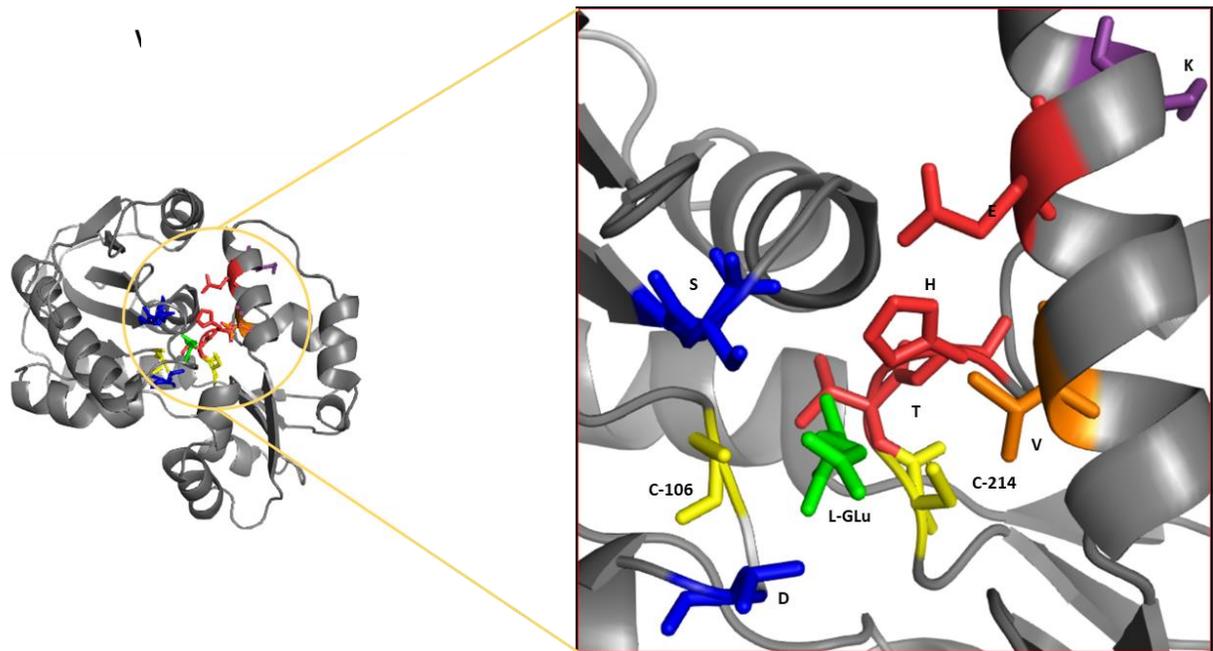


**Figura 6.** Condiciones de cristalización de VpGluR. (A): Formación de cristales y sus respectivos patrones de difracción de Crystal Screen 1 condición No. 26 y Crystal Sren 1 condición No. 35. Ejemplos de patrones de difracción de otras moléculas (B): proteínas (izquierda) y molécula pequeña (derecha).

El experimento de difracción por rayos X con los cristales obtenidos dio como resultado los patrones que se muestran en la figura 6-A, parte derecha. Dichos patrones no corresponden a los de una proteína, ya que como se contrasta en la figura 6-B, se comparan los patrones de difracción de una proteína (izquierda) y una molécula pequeña (derecha). Cuando el cristal está formado por una proteína, da como resultado un patrón de difracción con muchos spots (difracciones), debido a la gran cantidad de átomos presentes en la molécula; sin embargo, cuando el cristal está formado por una molécula pequeña o péptido, la cantidad de átomos presentes es mucho menor, por lo que el patrón de difracción muestra una menor cantidad de spots. En base a la premisa anterior, es posible decir que los supuestos cristales obtenidos de VpGluR, en realidad se encuentran formados por otro tipo de moléculas y no de la proteína de interés, como pudieran ser las sales presentes en las condiciones de cristalización. Por tal motivo, se sugiere optimizar las condiciones de cristalización en las que se presentaron cristales presumiblemente de VpGluR, con la finalidad de obtener cristales de mejor calidad que permitan un análisis de difracción de rayos X para la dilucidación de la estructura (Li *et al.*, 2008).

#### **6.1.5. Modelo estructural 3D *in silico* de VpGluR**

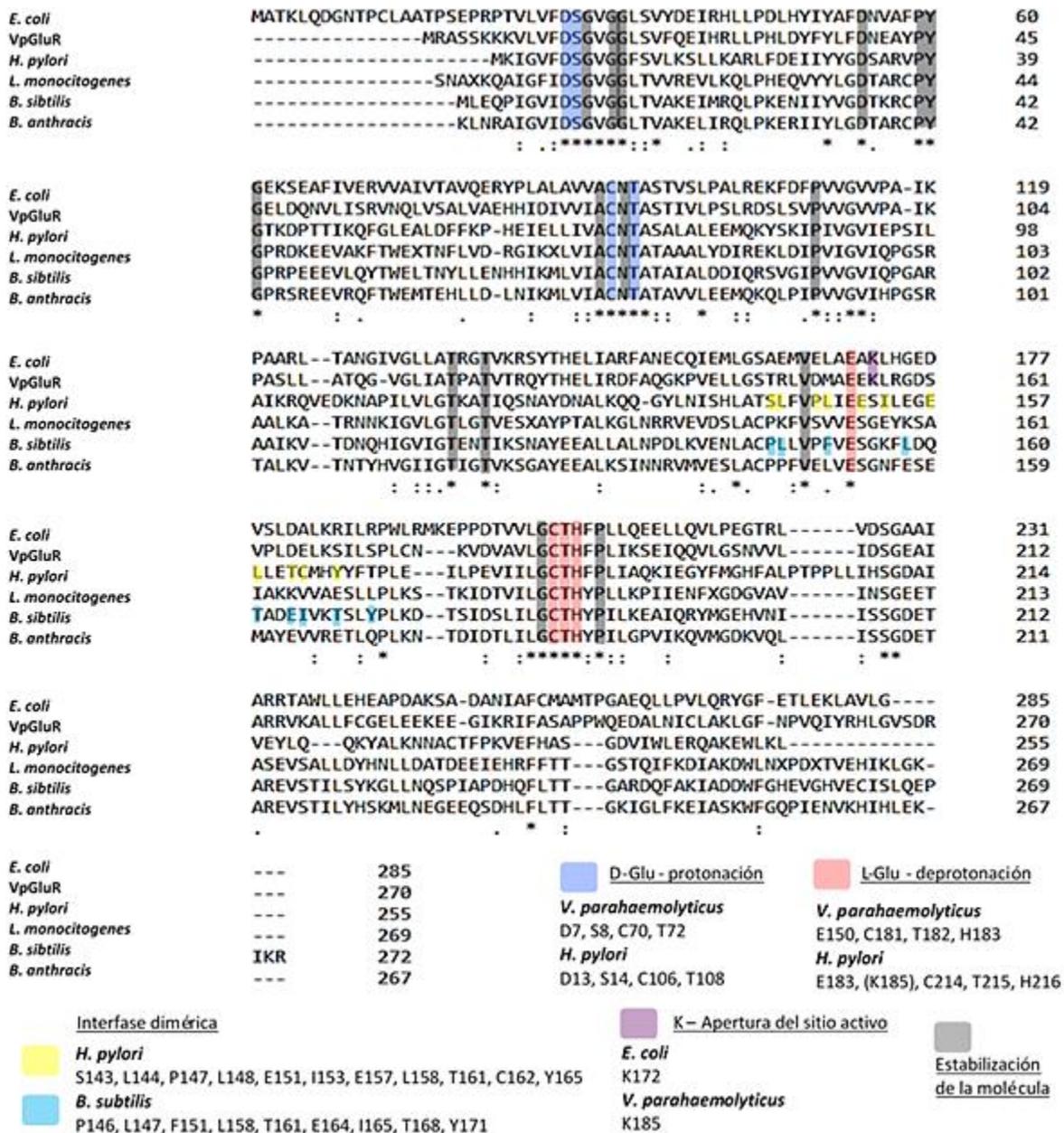
Para la dilucidación de la estructura teórica de VpGluR se realizó un modelo *in silico* mediante el servidor Phyre2, con el cual se obtuvo un modelo tridimensional (3D) de VpGluR. Dicho modelo se realizó mediante el protocolo de Phyre2 el cual consta de cuatro pasos. En primer lugar, se realiza una búsqueda de secuencias homólogas a nivel de aminoácidos en genomas secuenciados previamente y se realiza un alineamiento de las mismas; en base a dicho alineamiento se realiza una predicción mediante métodos heurísticos computacionales (algoritmo dentro de Phyre2) de la estructura secundaria de la proteína de interés según la posición de cada aminoácido en los homólogos encontrados. Posteriormente con el perfil obtenido, se convierte la predicción de estructura secundaria teórica a un modelo oculto de Márkov (HMM – hidden Markov model), el cual es un modelo estadístico para encontrar valores ocultos en parámetros observables, como una secuencia nucleotídica o aminoacídica (Govea, 2010).



**Figura 7.** Modelo estructural predictivo 3D de VpGluR. Proteína (izquierda), ampliación del sitio activo (derecha). Modelo obtenido mediante Phyre2 server de manera intensiva. Presenta un 51% de identidad con la estructura molde de EcGluR (2JFN) con un 100 % de confianza. Se muestran en color los residuos catalíticos encargados de la racemización del glutamato (amarillo), para la estabilización del sustrato durante la deprotonación (azul) y protonación (rojo); así como los relacionados a la estabilización del sitio activo (naranja y morado).

En el siguiente paso, se compara el perfil teórico de HMM de la proteína analizada contra el perfil calculado de HMM de estructuras determinadas experimentalmente. El resultado de dicho escaneo es una aproximación de la estructura con los aminoácidos que forman la cadena polipeptídica sin las cadenas laterales de cada residuo. El tercer paso consiste en modelar, en base al esqueleto obtenido anteriormente, las regiones de unión o ‘loops’ de la estructura secundaria (hélices alfa y láminas beta) en la proteína. El experimento *in silico* de la modelación estructural se realizó de manera ‘intensiva’, por lo que integró un paso más durante la modelación. Éste radicó en llevar a cabo una extracción de las distancias entre los carbonos alfa ( $C\alpha-C\alpha$ ) de la estructura primaria obtenida y compararlas con las mismas distancias de estructuras experimentales conocidas, para así conseguir una predicción fidedigna de la molécula analizada. Enseguida, la proteína de interés es sintetizada en un ribosoma virtual, para dar origen a una estructura tridimensional completa, a la cual finalmente se le agregan las cadenas laterales de cada residuo en base a sus rotámeros que favorecen la conformación más estable. De esta manera, la estructura que se utilizó como molde más adecuado para la creación del modelo 3D de VpGluR con un 100 % de confianza, fue la glutamato racemasa de *Escherichia coli* (EcGluR – PDB:2JFN), con la cual la VpGluR comparte 54 % de identidad en su secuencia de aminoácidos.

En el modelo 3D (figura 7) se observa la estructura de la proteína como monómero, la cual presenta un dominio en el extremo amino (N) terminal con 5 láminas beta rodeada por 5 hélices alfa, mientras que el extremo carboxilo (C) terminal se encuentra conformado por 4 láminas beta rodeadas por 5 hélices alfa. En la parte derecha de la figura 7 se muestra la ampliación del sitio activo, donde se aprecian los residuos catalíticos que llevan a cabo la función de isomerización o racemización sobre el glutamato. Dos cisteínas son las encargadas de la función catalítica, la cisteína 106 (C106) presente en el C-terminal y la cisteína (C214) del N-terminal. También están resaltados los residuos encargados de la estabilización del sustrato una vez que éste entra a la cavidad catalítica de la enzima. Lo anterior se puede verificar en la figura 8, donde se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de VpGluR con otras racemasas. En dicho alineamiento se advierten los aminoácidos relacionados a la estabilización del glutamato cuando es deprotonado (residuos resaltados en rojo) formando una base de Schiff, así como los residuos encargados de protonarlo (azul) nuevamente para finalizar la isomerización de la molécula; en color morado se resalta la lisina (K156) de VpGluR en similitud a la lisina (K172) de *E. coli*, la cual cumple una función de estabilización del sitio activo. Los residuos en color gris corresponden a los relacionados a la estabilización de la molécula (Gallo *et al.*, 1993b; Lundqvist *et al.*, 2007; Spies *et al.*, 2009; Whalen *et al.*, 2011). El modelo estructural permitió constatar que las GluRs mantienen conservados estos residuos esenciales para facilitar y llevar a cabo su función biológica, ya sea que se trate de enzimas monoméricas como la EcGluR o diméricas como las de HpGluR y BsGluR.



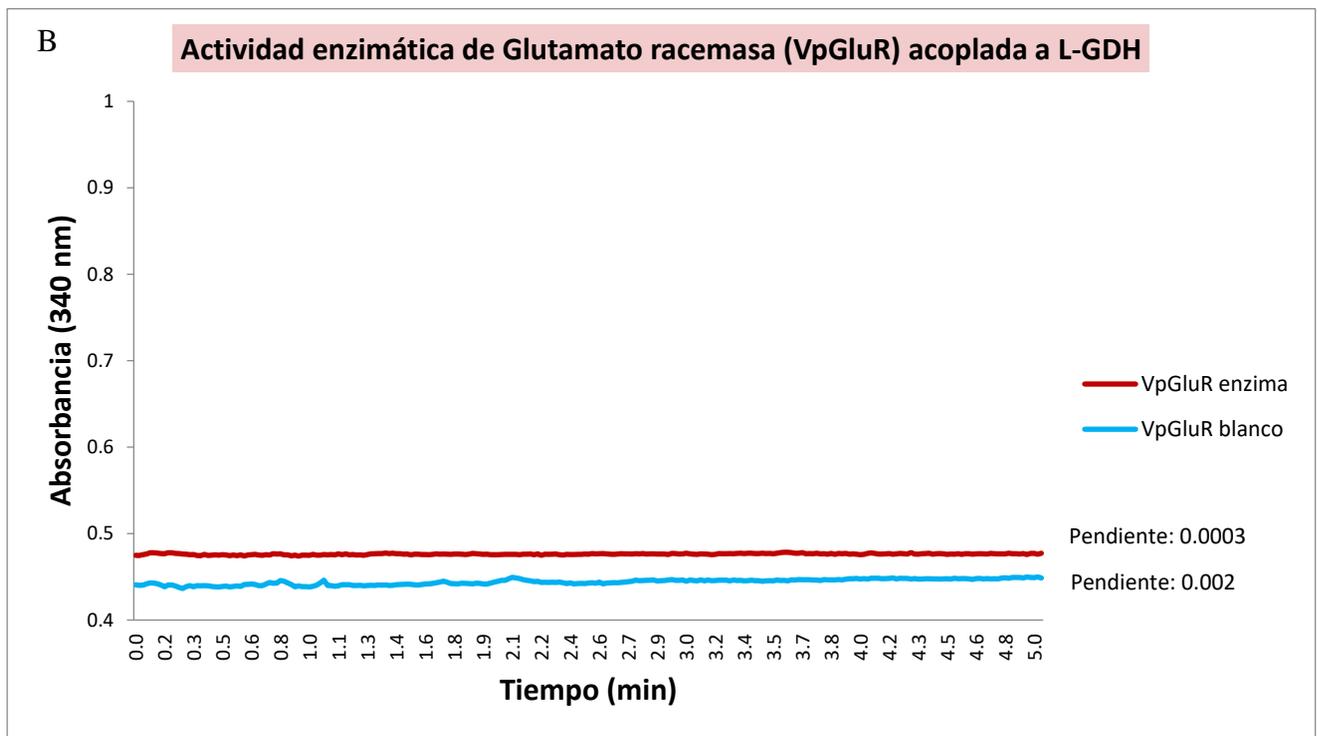
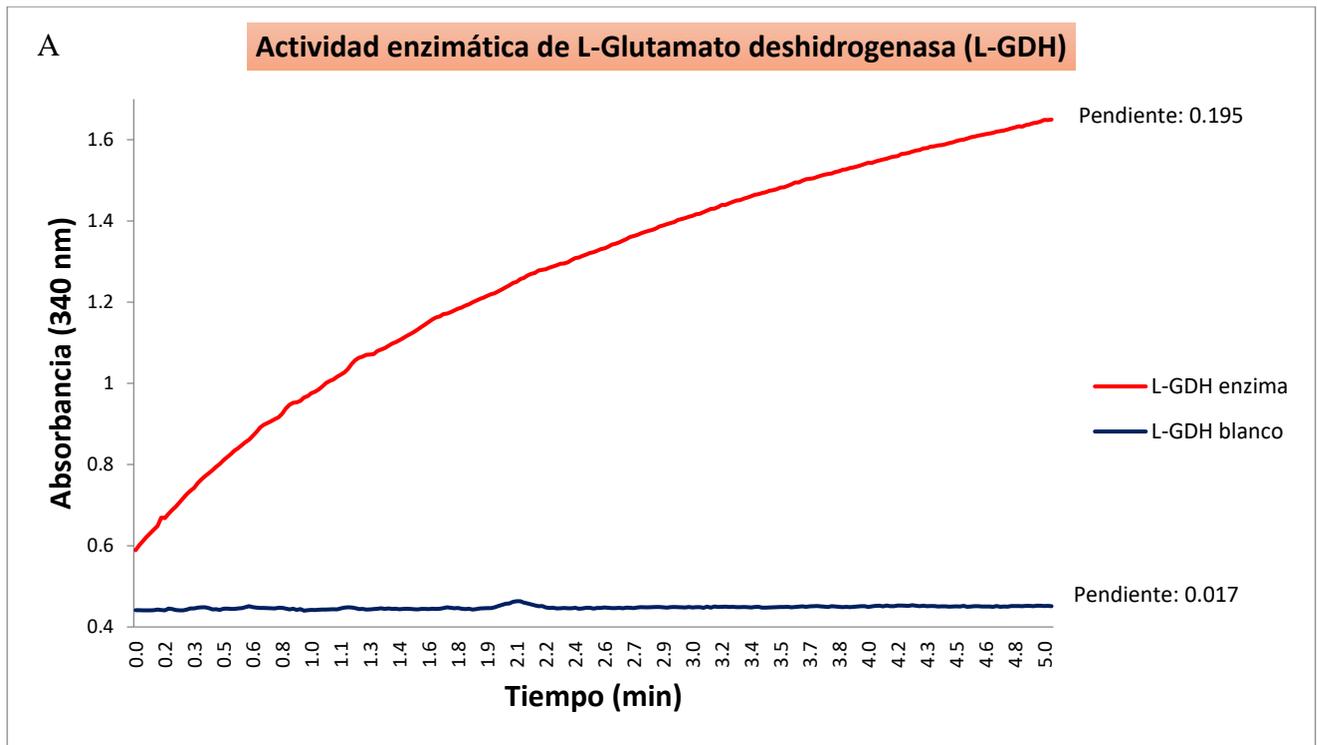
**Figura 8.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de VpGluR y otras racemasas. Residuos catalíticos resaltados en color azul y rojo, residuos de estabilización de la molécula resaltados en gris. Racemasas con estructura cuaternaria dimérica, se resaltan los residuos en dicha interfase en color amarillo y azul claro.

Por otro parte, es importante resaltar que sólo en algunas racemasas se han identificado los aminoácidos relacionados a la dimerización, como la glutamato racemasa de *H. pylori* (amarillo) y *B. subtilis* (azul) (Geng *et al.*, 2009; Dean *et al.*, 2015). En el alineamiento de la figura 8, se resaltan los residuos necesarios para la dimerización, en color amarillo (S143, L144, P147, L148, E151, I153, E157, L158, T161, C162, Y165) para la HpGluR y en azul (P146, L147, F151, L158, T161, E164, I165, T168, Y171) para la BsGluR; donde resalta que ambas enzimas presentan

residuos con propiedades químicas similares, como los residuos hidrofóbicos de leucina, isoleucina o tirosina los cuales repelen a las moléculas de agua y favorecen la interfase dimérica. En contraste con lo anterior, la VpGluR presenta diversos aminoácidos en dichas posiciones (T147, R148, D151, M152, E155, L157, G159, S161, V162, D165, E166, S169, S172); sin embargo, cuenta con pocos aminoácidos hidrofóbicos, por lo que sería muy interesante investigar a futuro si dichos residuos participan en la formación de la estructura cuaternaria de VpGluR. En otros estudios se ha observado que la dimerización de este tipo de enzimas puede fungir como en mecanismo de control y hasta coexistir en equilibrio ambas formas (monomérica y dimérica) en solución, siendo más activo el monómero que el dímero (Hwang *et al.*, 1999; Israyilova *et al.*, 2016).

#### **6.1.6. Actividad enzimática de VpGluR**

Se realizó el ensayo de actividad enzimática *in vitro* para VpGluR como se describió en el apartado de materiales y métodos. La actividad racemasa, isomerización del Glutamato, se acopló a una segunda reacción enzimática llevada a cabo por la L-glutamato deshidrogenasa (L-GDH). La enzima VpGluR isomeriza el L-Glu a D-Glu. En la reacción acoplada L-GDH convierte el sustrato D-Glu al ácido  $\alpha$ -cetoglutarato y utiliza  $\text{NAD}^+$  como cofactor para ser reducido a NADH; el cual absorbe a una longitud de onda de 340 nm, lo que permitió seguir la actividad de la enzima de interés. La figura 9 muestra la actividad enzimática tanto de VpGluR como de la enzima acoplada L-GDH. Se realizó un ensayo de actividad enzimática para L-DGH como control positivo de la reacción acoplada (figura 9-A); donde se observa que hay una diferencia de pendientes de 0.1933, entre el ensayo de actividad con todos los reactantes excepto la enzima (L-GDH blanco) y la muestra con enzima (L-GDH enzima) de 0.017 y 0.195 respectivamente. Con éstos valores, se obtuvo una actividad específica de 103.71  $\mu\text{M}$  de producto (NADH) formado por mg de L-GDH en un minuto, por lo que con este experimento se comprobó que la reacción acoplada se desempeña adecuadamente.



**Figura 9.** Actividad enzimática de VpGluR. Control positivo de la enzima acoplada L-GDH (A). El experimento mostró que el sistema acoplado funciona apropiadamente ya que L-GDH mostró actividad bajo las mismas condiciones que el ensayo para la enzima de interés. Ensayo de actividad enzimática de VpGluR acoplado a L-GDH (B). La enzima VpGluR presentó ausencia de actividad enzimática.

En la figura 9-B se observa el valor de las pendientes de la reacción sin enzima (VpGluR blanco) de 0.002 y el experimento con enzima (VpGluR enzima) de 0.003. La diferencia de pendientes fue -0.0017, lo que quiere decir bajo las condiciones experimentales desarrolladas, hubo ausencia de actividad enzimática de VpGluR. La proteína obtenida que corresponde al tamaño esperado de la enzima VpGluR de 32 kDa no presentó actividad racémica bajo las condiciones experimentales del presente estudio, por lo que es necesario analizar cuáles pudieron ser las causas de dicho resultado. El plegamiento de proteínas en la naturaleza, desde un enfoque termodinámico, sucede en distintas etapas o fases hasta llegar al estado energético más favorable o de menor energía libre de Gibbs, favoreciendo que la proteína se pliegue a su conformación nativa en la cual es más estable (Englander & Mayne, 2014). Existen dos formas de ver el plegamiento de proteínas, la clásica que considera que se presentan múltiples pasos secuenciales o estados intermedios en los que se pliega la proteína hasta alcanzar su conformación nativa y por lo tanto de menor energía. El otro enfoque es que hay múltiples rutas desde el estado con mayor entropía hasta el de menor energía, en los cuales se presentan diversos plegamientos proteínicos, los cuales ocurrirán reversiblemente hasta llegar al punto de transición donde se formarán plegamientos intermedios que favorecerán el plegamiento final de la proteína a su conformación nativa y menor estado energético (Maity *et al.*, 2005; Englander & Mayne, 2014). Estas dos perspectivas se complementan, ya que en el enfoque clásico pueden existir barreras energéticas (kinetic barriers) que propicien la formación de plegamientos intermedios solo en cierta parte de la población de una proteína dada; lo que llevaría a múltiples rutas en el plegamiento de la misma hasta alcanzar su conformación nativa.

Es así como la investigación del plegamiento y desnaturalización *in vitro* reversible de la ribonucleasa bovina (Anfinsen, 1973), permitió conocer que ésta se plegaba una y otra vez en una serie de pasos secuenciales como en el enfoque clásico. En contraste, la citocromo C mitocondrial (Englander & Mayne, 2014) se pliega de una manera inusual, acorde al segundo enfoque termodinámico. En una parte de la población de la proteína se pliegan primero las secuencias extremas del N y C terminal y por último las secuencias que están hacia el interior de la proteína globular; sin embargo, otra parte de la población se pliegan primero las secuencias de aminoácidos que se encuentran hacia el interior y a lo último las que se encuentran hacia el exterior (N y C terminal), lo cual favorece que existan distintos y diversos plegamientos intermedios inactivos o no funcionales antes de alcanzar el estado energético más favorable, permitiendo ambas maneras que se alcance el plegamiento nativo de la proteína activo o funcional (Roder *et al.*, 1988; Nawrocki *et al.*, 1999; Englander & Mayne, 2014).

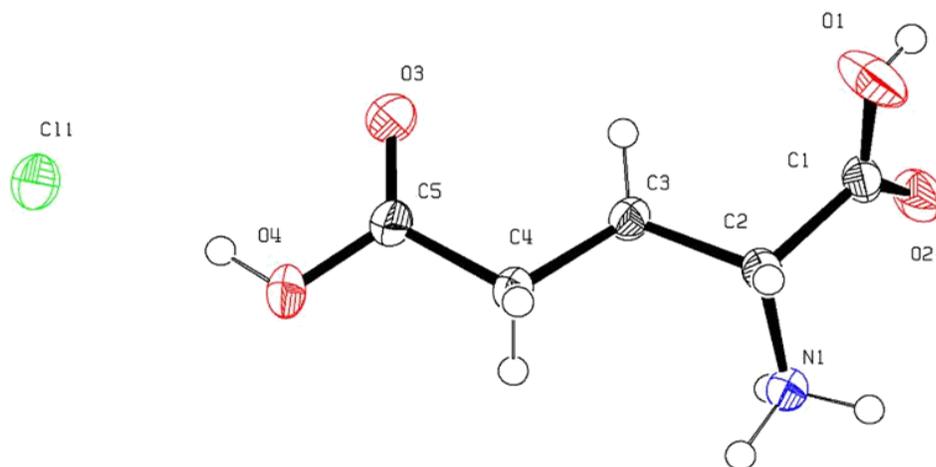
Los resultados del replegamiento y actividad enzimática, así como el estado oligomérico determinado por filtración en gel se puede contrastar con lo antes mencionado. La evidencia de los experimentos constata que se logró obtener a la VpGluR de manera soluble y pura como se discutió anteriormente; sin embargo, la enzima no presentó actividad enzimática como isomerasa. Esto puede deberse a que la proteína durante el replegamiento *in vitro* se haya plegado y quedado en una fase intermedia, por lo que no se plegó correctamente en su conformación nativa y funcional. Por otra lado, diversas investigaciones en el replegamiento *in vitro* de proteínas han encontrado que a pesar de tener en cuenta variables como la fuerza iónica, presencia de aditivos y proteínas chaperonas que favorezcan el plegamiento nativo, acidez o alcalinización de la solución (pH) y punto isoeléctrico de la proteína de interés, entre otros, es posible que la proteína no se pliegue correctamente y ésta se encuentre de manera soluble e inactiva (Bondos & Bicknell, 2003; Burgess, 2009; Tyedmers *et al.*, 2010; Yuasa *et al.*, 2014; Yamaguchi & Miyazaki, 2014); tal como se obtuvo en el presente estudio de la VpGluR. De esta forma, el resultado de la filtración en gel en donde se determina el estado oligomérico de la enzima, es posible que se deba a que la proteína de interés probablemente no se plegara de manera nativa, sino en un plegamiento intermedio; por lo que se se haya favorecido la interacción de oligómeros de la misma. Es posible que dichos oligómeros den origen al resultado obtenido en la figura 5 como tetrámero de VpGluR y por consiguiente afectar el proceso de cristalización, al no ser una solución uniforme de la proteína con una forma oligomérica definida. Hasta donde se conoce actualmente, éstas enzimas presentan una estructura terciaria en forma de monómero o cuaternaria en forma de dímeros, como se observa en la figura 8, donde EcGluR es monomérica y HpGluR/BsGluR son diméricas.

## 6.2. D-Glutamato:cloro – D-Glu:Cl

### 6.2.1. Estructura cristalográfica de D-Glu:Cl

Se realizó la caracterización estructural del sustrato de la enzima VpGluR, el D-glutamato y se obtuvo su estructura cristalográfica con un átomo de cloro, D-glutamato:cloro (D-Glu:Cl). La figura 10 muestra la estructura cristalográfica de D-Glu:Cl en representación ORTEP (Farrugia,

2012), donde la posición de cada átomo del compuesto corresponde a las vibraciones térmicas dibujadas en elipsoides, los cuales se representan como el 50 % de probabilidad de encontrar la masa del átomo en dicha posición.



**Figura 10.** Representación ORTEP de la unidad asimétrica de D-Glu-Cl. Los elipsoides fueron dibujados al 50% de probabilidad.

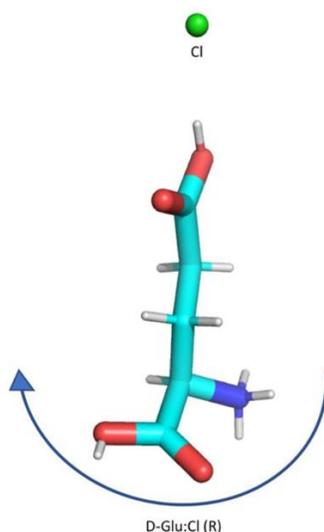
En el cuadro 1 se muestran los datos cristalográficos de la estructura de D-Glu:Cl, el cual cristalizó como un sistema cristalino ortorrómbico y grupo espacial No. 19 ( $P2_12_12_1$ ), con un valor de Z igual a 4 moléculas por celda unitaria, similar a lo estudiado en el isómero L-Glu (Fox-Uribe *et al.*, 2017). Sin embargo, la presencia de un átomo de yodo (Delfino *et al.*, 1978), clorhidrato o bromohidrato (Kirfel & Wallrafen, 1985) en la estructura, generó un cambio en el volumen y dimensiones de la celda unitaria, como sucedió en la presente investigación con el átomo de cloro (Fox-Uribe *et al.*, 2019); propiciando que la cadena lateral del aminoácido se encontrara en una posición más restringida.

Aunque se conoce previamente la estructura cristalográfica de otros glutamatos, acorde a lo depositado en la base de datos de Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) como LGLUAC (Hirokawa, 1955), LGLUAC01 (Marcoin *et al.*, 1999), LGLUAC02 (Hirayama *et al.*, 1980), LGLUAC03 (Lehmann & Nunes, 1980) y LGLUAC11 (Lehmann *et al.*, 1972); en ninguno de los anteriores se determinó la configuración absoluta de la estructura cristalográfica que permita la identificación correcta entre las formas enantioméricas del aminoácido. Por lo que se prosiguió a la determinación de la configuración absoluta de D-Glu:Cl.

**Cuadro 1.** Datos cristalográficos experimentales de D-Glu:Cl (R) y D-Glu (S). D-Glu:Cl en configuración (S) fue analizada como si la estructura se presentara en el estereoisómero L.

Datos cristalográficos de:	D-Glu:Cl (R)	D-Glu:Cl (S)
Fórmula empírica	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> Cl N O <sub>4</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> Cl N O <sub>4</sub>
Peso de la fórmula	182.58 g/mol	183.59 g/mol
Temperatura	300(2) K	300(2) K
Longitud de onda	1.54178 Å	1.54178 Å
Sistema cristalino	Orthorhombic	Orthorhombic
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Dimensiones de la celda unitaria	$a = 5.1363(2)$ Å $b = 11.7497(4)$ Å $c = 13.2871(5)$ Å	$a = 5.1363(2)$ Å $b = 11.7497(4)$ Å $c = 13.2871(5)$ Å
Volumen	801.88(5) Å <sup>3</sup>	801.88(5) Å <sup>3</sup>
Z	4	4
Densidad (calculada)	1.512 mg/m <sup>3</sup>	1.521 mg/m <sup>3</sup>
Coefficiente de absorción	4.033 mm <sup>-1</sup>	4.033 mm <sup>-1</sup>
F(000)	380	384
Tamaño del cristal	0.250 x 0.100 x 0.025 mm <sup>3</sup>	0.250 x 0.100 x 0.025 mm <sup>3</sup>
Rango de theta para colecta de datos	5.025 to 74.420°.	5.025 to 74.420°.
Rango de índices	-6<=h<=6, -14<=k<=14, -16<=l<=16	-6<=h<=6, -14<=k<=14, -16<=l<=16
Reflexiones colectadas	15237	15237
Reflexiones independientes	1630 [R(int) = 0.0337]	1630 [R(int) = 0.0337]
Completos a theta = 67.679°	99.80%	99.80%
Método de refinamiento	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Datos / restricciones / parámetros	1630 / 0 / 114	1630 / 0 / 114
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.068	1.09
Índices finales de R [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0220, wR2 = 0.0592	R1 = 0.0450, wR2 = 0.1169
Índices R (all data)	R1 = 0.0223, wR2 = 0.0594	R1 = 0.0454, wR2 = 0.1172
Estructura absoluta	Hooft y determined using 647 Bijvoet pairs (Hooft et al., 2008), Bijvoet pairs = 640, coverage = 0.99, Bayesian statistics: student-T (Nu = 99) (Hooft et al., 2010), P2(true) = 1.000, P3(true) = 1.000, P3(rac-twin) = 0.0E+00, P3(false) = 0.0E+00, G = 0.8848, G (s.u.) = 0.0129	Hooft y determined using 647 Bijvoet pairs (Hooft et al., 2008), Bijvoet pairs = 640, coverage = 0.99, Bayesian statistics: student-T (Nu = 51) (Hooft et al., 2010), P2(true) = n/a, P3(true) = 0.0E+00, P3(rac-twin) = 0.0E+00, P3(false) = 0.2E-24, G = -0.8912, G (s.u.) = 0.0128
Parámetro de Flack (x)	0.055(4)	0.944(4)
Largest diff. peak and hole	0.161 and -0.232 e.Å <sup>-3</sup>	0.182 and -0.256 e.Å <sup>-3</sup>

6.2.1.1. Orientación y configuración absoluta teórica de la estructura cristalográfica D-Glu:Cl. Una vez obtenida la estructura cristalográfica, se le asignó la configuración absoluta a D-Glu:Cl de acuerdo a las reglas propuestas por Cahn *et al.* (1956) para compuestos quirales (figura 11). Así pues, para conocer la orientación de la molécula y determinar su configuración absoluta de manera teórica, se asignó un número de menor a mayor prioridad, donde el grupo funcional que posee un peso (masa) mayor, recibió un número mayor o prioridad alta y al de menor peso se le asignó un número menor o prioridad baja. Es así como en el D-Glu:Cl, el grupo amino ( $\text{NH}_3$ ) posee una masa menor (17) comparado contra el grupo carboxilo ( $\text{COOH}$ ) con una masa mayor (45), por lo que la asignación del sentido de la molécula será en base a como se encuentra ésta orientada según las manecillas del reloj, empezando del grupo funcional de menor peso molecular al mayor. De este modo, se le asignó la configuración absoluta a D-Glu:Cl como una molécula R o rectus, siendo su nombre correcto D-Glu:Cl(R).



**Figura 11.** Configuración absoluta de D-Glu:Cl. Acorde a las reglas de Cahn-Ingold y Prelog (1996).

Los estudios de compuestos orgánicos quirales han mostrado que es posible identificar los estereoisómeros de las moléculas quirales y asignar inequívocamente su configuración absoluta de manera experimental. Esto se ha realizado mediante experimentos cristalográficos y de difracción de rayos X a baja temperatura (-100 K), en las cuales se han empleado diversas fuentes de radiación, tales como Cu-K $\alpha$ , Co-K $\alpha$  o Mo-K $\alpha$  (Kivikoski *et al.*, 1993; Fun *et al.*, 2011, 2010; Strakova *et al.*,

2011; Mondal *et al.*, 2013; Masi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). Sin embargo, recientemente se comenzó a llevar a cabo éste tipo de estudios a temperatura ambiente, donde se utilizó el Mo-K $\alpha$  como fuente de radiación para determinar la configuración absoluta (Bredikhin *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018). A diferencia de las investigaciones antes mencionadas, cabe resaltar que en el presente estudio se utilizó radiación por Cu-K $\alpha$  y temperatura ambiente (25 °C) durante los experimentos de difracción de rayos X; por lo que se demostró que es posible determinar y asignar experimentalmente la configuración absoluta de compuestos quirales como el D-Glu:Cl bajo dichas condiciones,.

### **6.2.2. Asignación experimental de la configuración absoluta de D-Glu:Cl en base a su estructura cristalográfica.**

Previo al análisis de la configuración absoluta de D-Glu:Cl, se realizó el refinamiento de la estructura mediante el método de mínimos cuadrados como se muestra en cuadro 1. Se observó que el ajuste (Goodness-on-fit on  $F^2$ ) fue de 1.068, un valor cercano a 1. Lo anterior indica que el modelo estadístico es cercano a los datos observados, confirmándolo como buen modelo de estimación para los análisis estadísticos experimentalmente de difracción de rayos X, para determinar correctamente la configuración absoluta del glutamato. El cuadro 1 muestra también un análisis (refinamiento) de la estructura como si éste fuese el isómero D-Glu:Cl(S), ya que éste fungió como control negativo para la asignación de la configuración absoluta. Es así como se advierte que el valor del ajuste del modelo para D-Glu:Cl (S) fue de 1.090, lo cual quiere decir que el modelo estadístico está acorde con los datos experimentales y no es posible diferenciar entre D-Glu:Cl(R) o D-Glu:Cl(S).

Al comparar los parámetros de calidad en el refinamiento de la estructura, se obtuvieron valores contrastantes de R's (Spek, 2009), donde para D-Glu:Cl(R) se obtuvieron valores finales de  $R1 = 0.0223$  y  $wR2 = 0.0594$ , es decir, existe una correspondencia entre los datos obtenidos y los datos trabajados. Por otro lado, al comparar estos parámetros en el refinamiento de D-Glu:Cl(S), se obtuvieron valores de  $R1 = 0.0454$  y  $wR2 = 0.1172$ , lo que significa que el refinamiento no es bueno y por lo tanto la estructura determinada no es la correcta. De esta manera, se corroboraron

los valores de  $2\theta$ , los cuales se encontraron de 10.01 a 74.42, lo que permitió que existiese una dispersión adecuada de los rayos X (Hooft *et al.*, 2008) en el experimento de difracción y permitió obtener buenos valores de dispersión para determinar la estructura y configuración absoluta de la molécula. Lo anterior fue indispensable para el experimento de difracción y la obtención de datos de muy buena calidad en el patrón de difracción y calcular la diferencia de intensidades para el análisis estadístico de los pares Bijvoet.

En el refinamiento de la estructura del D-Glu:Cl se obtuvieron los siguientes valores en los parámetros que asignan la configuración absoluta, Flack ( $x$ ), Parsons ( $Z$ ), Hooft ( $y$ ) y Hooft ( $G$ ), tanto para D-Glu:Cl(R) como D-Glu:Cl(S) (Flack, 1983; Spek, 2003; Parsons *et al.*, 2013; Hooft *et al.*, 2008; Murakami *et al.*, 2010). Los valores obtenidos para D-Glu:Cl(R) fueron de  $x = 0.055(4)$ ,  $Z = 0.057(6)$ ,  $y = 0.058(6)$  como se observa en el cuadro 2. Lo anterior indica que existe una concordancia entre los parámetros, ya que todos muestran un valor cercano a 0 y un valor bajo de incertidumbres estándar estimadas (esd). Esto quiere decir que la estructura y su configuración absoluta asignada es la correcta. Por el contrario, al refinar la estructura como si en realidad fuera el estereoisómero D-Glu:Cl(S), se obtuvieron valores contrastantes en los parámetros de configuración absoluta,  $x = 0.944(4)$ ,  $Z = 0.944(6)$ ,  $y = 0.946(6)$ , los cuales también presentan concordancia entre ellos. La obtención de valores cercanos a 1 indican que la configuración absoluta asignada es incorrecta o que en realidad la estructura es el isómero, confirmando que en realidad la configuración absoluta correcta del glutamato es D-Glu:Cl(R).

**Cuadro 2.** Valores de los parámetros de configuración absoluta para D-Glu:Cl (R) y D-Glu (S).

	Flack ( $x$ )	Parsons ( $Z$ )	Hooft ( $y$ )	Hooft ( $G$ )
D-Glu:Cl (R)	0.055 (4)	0.057 (6)	0.058 (6)	0.8848 (0.0129)
D-Glu:Cl (S)	0.944 (4)	0.944 (6)	0.946 (6)	-0.8912 (0.0128)

Al comparar el parámetro de configuración absoluta de Hooft ( $G$ ), el cual está basado en los datos observados (intensidades) únicamente, se corroboran los resultados obtenidos en los otros parámetros tanto para D-Glu:Cl(R) como D-Glu:Cl(S). De esta manera, cuando se refinó la estructura como D-Glu:Cl(R) se obtuvo un valor de  $G = 0.8848(0.0129)$  y al refinarla como el

isómero D-Glu:Cl(S) este fue de  $G = -0.8912(0.0128)$ . En  $G$  los valores van de -1 a 1 en lugar de 0 a 1 como en los otros tres parámetros, considerando que cuando el valor es cercano a 1 significa que la configuración absoluta es la correcta, mientras que si el parámetro es cercano a -1, la configuración absoluta es incorrecta o en su defecto la estructura es el estereoisómero, tal como se aprecia en los parámetros antes discutidos. De esta manera, el parámetro  $G$  confirmó lo obtenido mediante los parámetros de Flack ( $x$ ), Parsons ( $Z$ ) y Hooft ( $y$ ) y la configuración absoluta asignada es la correcta, como D-Glu:Cl(R).

En el análisis de los pares de Bijvoet, los cuales son utilizados para calcular la diferencia de intensidades en la estructura, se obtuvieron 604 pares para el refinamiento de D-Glu:Cl(R) con una cobertura del 99%. Del total de pares de Bijvoet, 574 pares (puntos negros) fueron asignados correctamente y 30 sin asignar (puntos rojos) como se observa en la figura 12 parte superior; lo anterior indica que la estructura sí es D-Glu:Cl(R). Por el contrario, al refinar el glutamato:cloro como el isómero D-Glu:Cl(S) con la asignación de la configuración absoluta errónea o invertida, se obtuvo que solamente 27 pares (negros) fueron asignados correctamente, mientras que el resto, 570 pares (rojo) fueron asignados incorrectamente o de manera invertida (estructura absoluta invertida). Este resultado está acorde con lo obtenido en los parámetros de la configuración absoluta descritos anteriormente, lo que en conjunto indica que la configuración absoluta correcta es (R).

Como comprobación de los resultados anteriores, se llevó a cabo un análisis estadístico bayesiano, como se muestra en la parte derecha de cada imagen en la figura 12. Para ello se realizó la prueba de probabilidad para hipótesis de dos (P2 – correcto, P2 – incorrecto) y tres vías (P3 – correcto, P3 – gemelo racémico, P3 – incorrecto) (Hooft *et al.*, 2008) para el refinamiento y asignación de la configuración absoluta del compuesto D-Glu:Cl. De esta manera, se llevó a cabo el análisis estadístico asumiendo que la estructura presenta una configuración absoluta como “R”, donde se obtuvieron los siguientes resultados:  $P2(\text{true}) = 1.000$  y  $P3(\text{true}) = 1.000$ , los cuales indican que la asignación dada a la estructura es la correcta; así como valores de  $P3(\text{rac-twin}) = 0.0E+00$  y  $P3(\text{false}) = 0.0E+00$ , lo que indica que no hay otras alternativas para la asignación de la configuración absoluta.

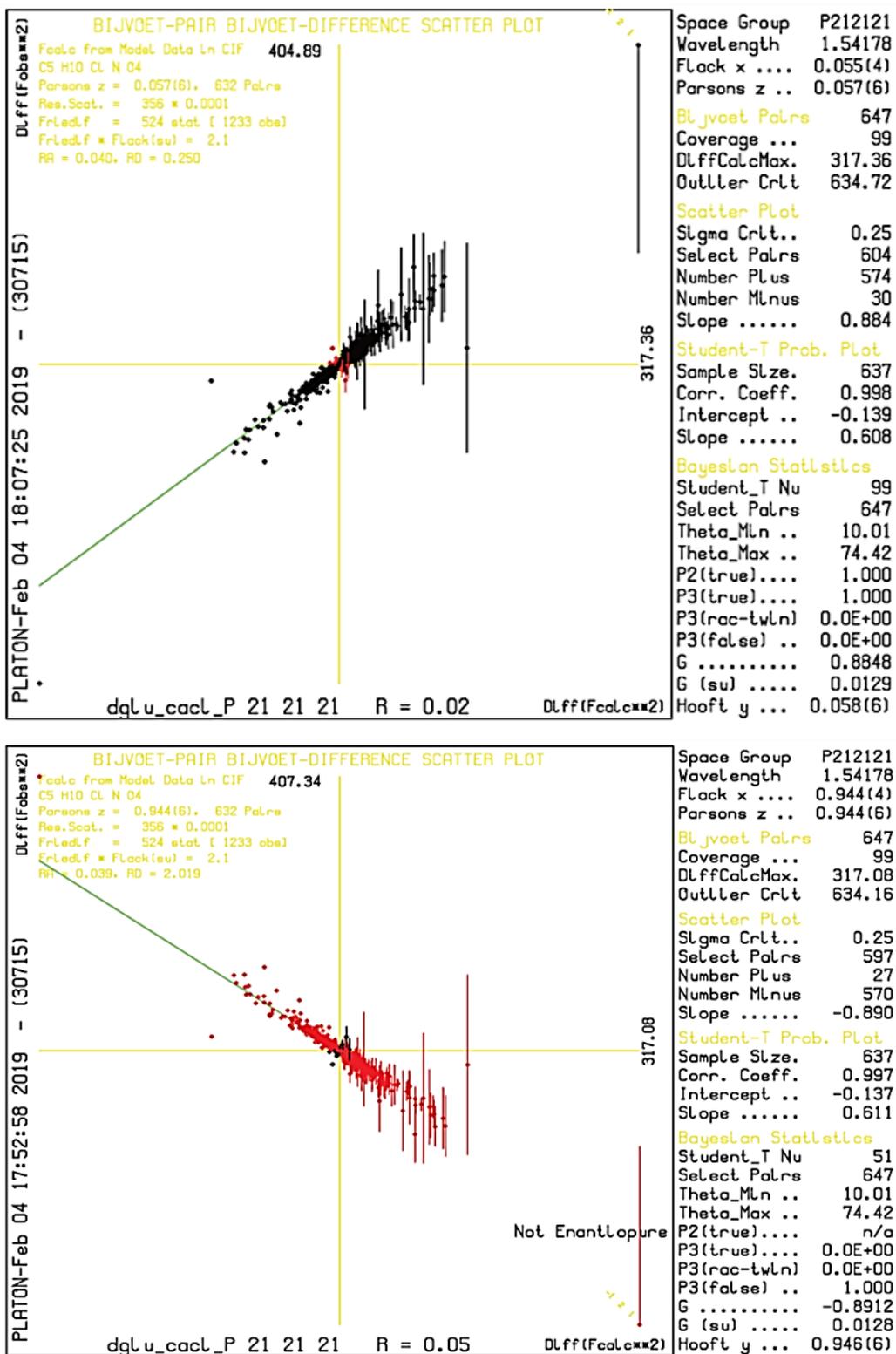
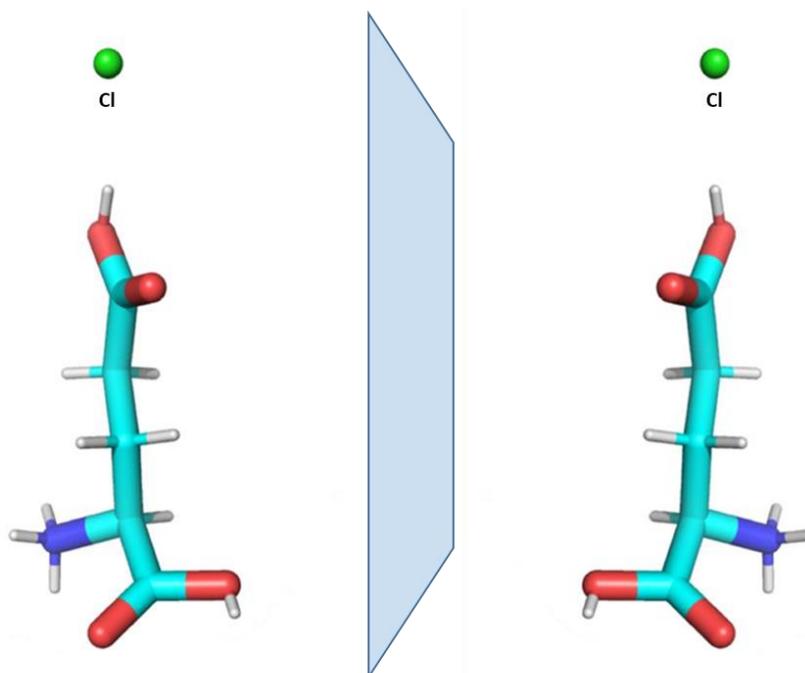


Figura 12. Pares de Bijvoet y análisis estadístico de D-Glu:Cl (R) (arriba) y D-Glu:Cl (S) (abajo).

Los resultados del refinamiento de D-Glu:Cl con el mismo juego de datos, pero con la diferencia

de asumir que la estructura presenta una configuración absoluta como “S” (figura 12 imagen inferior), arrojaron valores que comprueban que la estructura correcta es D-Glu:Cl “R”. Es así como las pruebas de hipótesis de dos y tres vías resultaron contrarias a los resultados obtenidos anteriormente:  $P_2(\text{true}) = \text{n/a}$ ,  $P_3(\text{true}) = 0.0\text{E}+00$ ,  $P_3(\text{rac-twin}) = 0.0\text{E}+00$  y  $P_3(\text{false}) = 1.000$ . Los resultados anteriores indican entonces que la asignación de la configuración absoluta de D-Glu:Cl como “S” es incorrecta, corroborando que la configuración absoluta asignada es D-Glu:Cl(R), tal como se observó en los parámetros experimentales del cuadro 2. Por último, la prueba T de student para cada refinamiento de D-Glu:Cl como “R” o “S”, ratificó los resultados obtenidos. La prueba T de student explica el 99 % de los datos cuando se asigna la configuración absoluta como “R” (hipótesis nula), denotando que ésta asignación es la correcta; por el contrario, dicha prueba estadística sólo alcanzó a explicar el 51 % de los datos (imagen no mostrada) cuando se asigna la configuración absoluta como “S”. Es así como esta prueba corrobora y valida los resultados tanto de la estadística bayesiana como los parámetros experimentales. Por todo lo anterior fue posible asignar de manera certera e inequívoca la configuración absoluta del compuesto en estudio como D-Glu:Cl(R), tal como se observa en la parte derecha de la figura 13.



**Figura 13.** Configuración absoluta de D-Glu:Cl (R) obtenido por difracción de rayos X. Configuración absoluta como (S) y errónea (izquierda), configuración absoluta como (R) y correctamente determinada (derecha).

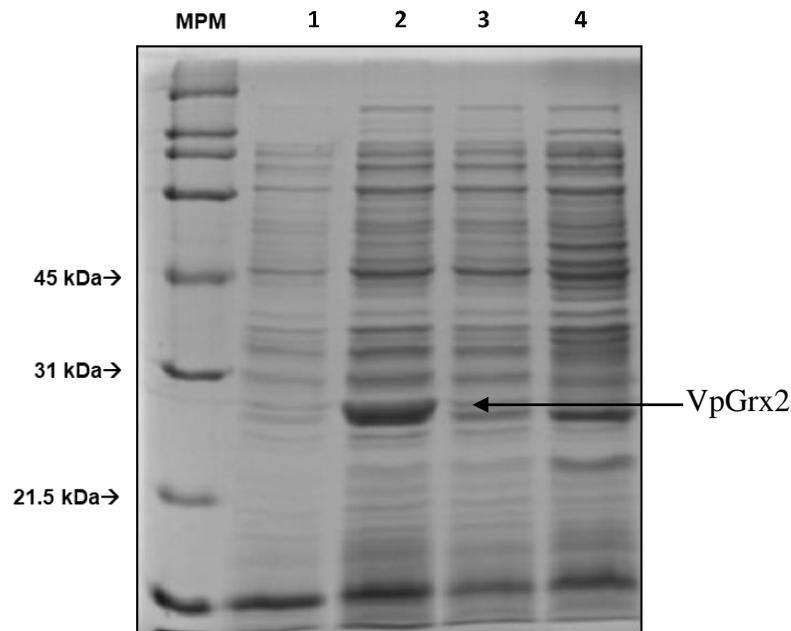
A la fecha son pocas las investigaciones donde se ha obtenido la estructura cristalográfica y asignación de la configuración absoluta de compuestos quirales a través de experimentos de difracción de rayos X a temperatura ambiente utilizando Cu-K $\alpha$  como fuente de radiación (Fan *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018; Galal *et al.*, 2018), como en la presente investigación; esto es de suma importancia, ya que el dilucidar y conocer la estructura y configuración absoluta de un compuesto quiral como D-Glu:Cl(R) permite diseñar de una manera exacta inhibidores específicos o análogos de dichos compuestos quirales. Por otra parte, el conocer la estructura de una proteína para la cual se busca diseñar un inhibidor específico, como VpGluR, permitirá esclarecer y determinar con exactitud los residuos involucrados en contacto con el sustrato, análogo o inhibidor; así como esclarecer las interacciones con dichos compuestos. De esta manera es posible identificar correctamente los compuestos quirales, sean sustratos o inhibidores, entre otros (Flack & Bernardinelli, 2008; Ortega *et al.*, 2017).

En investigaciones anteriores se han estudiado y diseñado inhibidores específicos para racemasas y se ha corroborado si el inhibidor pertenece al estereoisómero levógiro (L) o dextrógiro (D) (Glavas & Tanner, 1997; Lundqvist *et al.*, 2007; Whalen *et al.*, 2010). Sin embargo, actualmente mediante la cristalografía y difracción de rayos X, como lo realizado en el presente estudio, es posible conocer si el compuesto es D o L y asignar su configuración absoluta como R o S, sin necesidad de someterlo a un ensayo enzimático previo. En este contexto, las recomendaciones para los siguientes experimentos consisten en obtener la estructura cristalográfica de VpGluR en forma apo y holo (VpGluR + D-Glu), de tal manera que se permita conocer los residuos participantes en la interacción con el sustrato con el objetivo de diseñar un inhibidor específico a mediano o largo plazo para VpGluR que permita detener al agente patógeno como *V. parahaemolyticus* en su proceso infeccioso en el camarón blanco.

### 6.3. Glutarredoxina 2 – VpGrx2

#### 6.3.1. Expresión heteróloga de VpGrx2

La proteína VpGrx2 (27 kDa) recombinante se expresó de manera soluble mostrando una banda del tamaño esperado sobreexpresada a las 4 h después de la inducción de la misma (Zaffagnini *et al.*, 2008), como lo muestra la figura 14 – carril 2. Por ello se eligió este tiempo como límite para el experimento *in vitro* de sobreexpresión heteróloga de la proteína de interés, ya que posterior a las 4 horas, se observa una banda del tamaño esperado de menor intensidad a las 24 h (carril 4), indicando que existe una menor cantidad de proteína expresada.

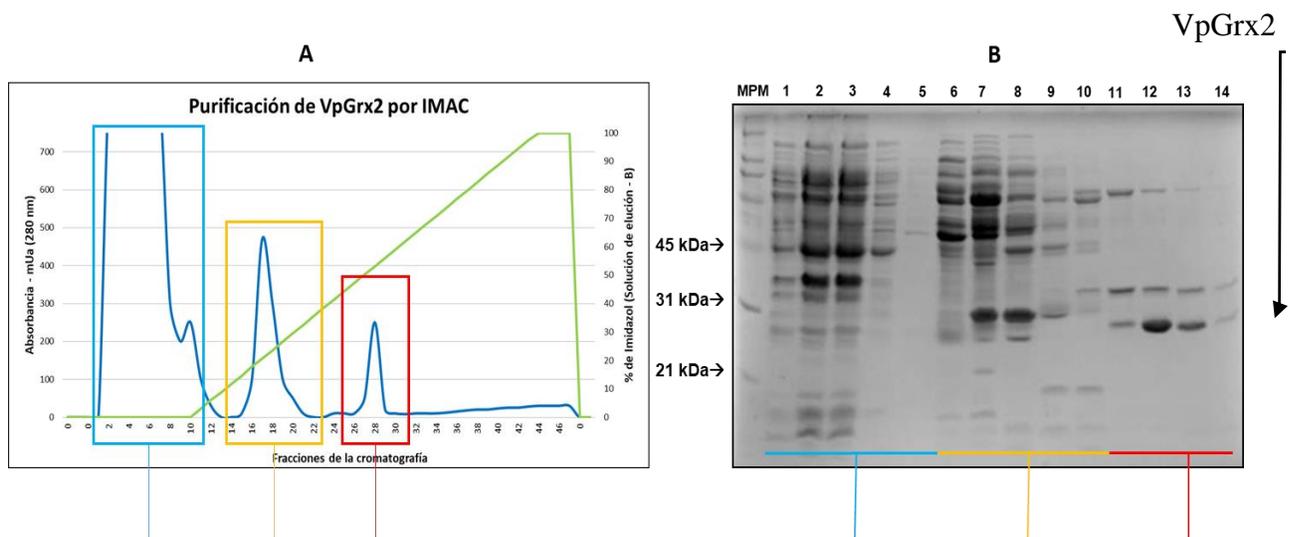


**Figura 14.** Cinética de sobreexpresión de VpGrx2. Marcador de peso molecular Broad Range (MPM), tiempos de expresión de manera soluble 0, 4, 6 y 24 h (carriles 1-4). VpGrx2 se sobreexpresó mayoritariamente de manera soluble a las 4 h.

### 6.3.2. Purificación de VpGrx2 por cromatografía de afinidad y exclusión molecular.

La purificación de la proteína se realizó en dos pasos cromatográficos consecutivos. Primero se realizó una purificación de la proteína sobreexpresada mediante cromatografía de afinidad (IMAC) y posteriormente por filtración en gel o exclusión molecular; ésta última permitió purificar a VpGrx2 y determinar el estado oligomérico de la proteína.

6.3.2.1. Purificación de VpGrx2 por IMAC. La figura 15-A muestra el cromatograma de la primera etapa de purificación de VpGrx2 por IMAC, en esta imagen se observan dos picos durante la elución, asumiéndose que en uno de ellos eluyó la proteína del tamaño esperado.

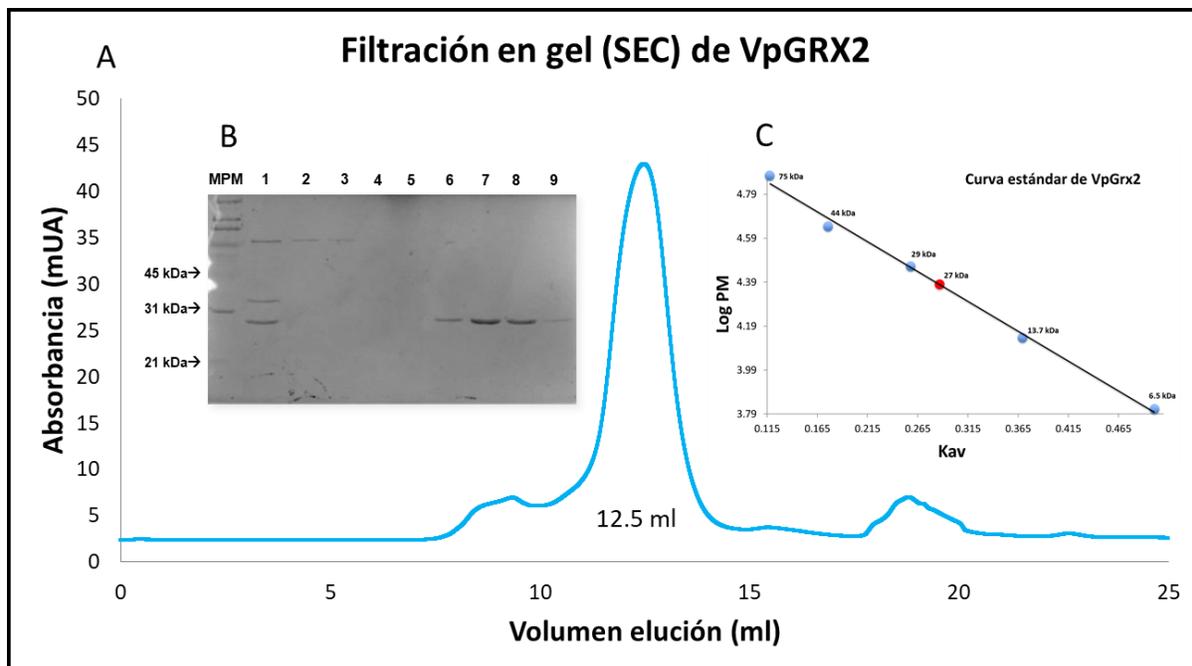


**Figura 15.** Purificación de VpGrx2 por IMAC. Cromatograma (A), fracciones 1-11: no unido (UN), 14-22: uniones inespecíficas (UNE), 26-29 (34-40 % B): proteína del tamaño aproximado (27 kDa) VpGrx2. Electroforesis en gel (SDS-PAGE 12 %) de las fracciones cromatográficas (B), MPM Broad Range, muestra inyectada (carril 1), proteína no unida (carriles 2-5), uniones inespecíficas (carriles 6-10), fracciones de VpGrx2 eluida entre 30-40% B (175-200 mM imidazol) (carriles 11-14) mayormente pura.

Lo anterior se confirmó al analizar las fracciones de la cromatografía por electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), como se observa en la figura 15-B. Se observó que la banda del tamaño esperado eluyó a una concentración de 175 – 200 mM de imidazol

(30 – 40 % B), correspondiente al segundo pico de la cromatografía y no pertenece a la población de proteínas unidas de manera inespecífica, como lo muestra la figura 15-A en el primer pico durante la elución. Sin embargo, la proteína del tamaño esperado no se encontró totalmente pura, ya que se presentaron otras bandas o proteínas contaminantes en las fracciones de interés. Por lo tanto, se juntaron las fracciones y se realizó a una segunda cromatografía.

6.3.2.2. Purificación de VpGrx2 por filtración en gel y determinación de su estructura cuaternaria. En esta cromatografía, la proteína con el tamaño esperado de VpGrx2 (27 kDa) se purificó completamente y se determinó su estado oligomérico.



**Figura 16.** Purificación de VpGrx2 por SEC. Cromatograma (A): proteína pura eluida a 12.5 ml de retención en las fracciones 6-9. Electroforesis en gel (SDS-PAGE 12 %) de las fracciones cromatográficas (B): MPM Broad Range, fracciones de la proteína pura del tamaño aproximado a (27 kDa) VpGrx2 (carriles 6-9), fracciones con proteína de no interés (carriles 1-5). Curva estándar de VpGrx2 (C): valor representativo (punto rojo) de la estructura terciaria de VpGrx2 (27 kDa=monómero).

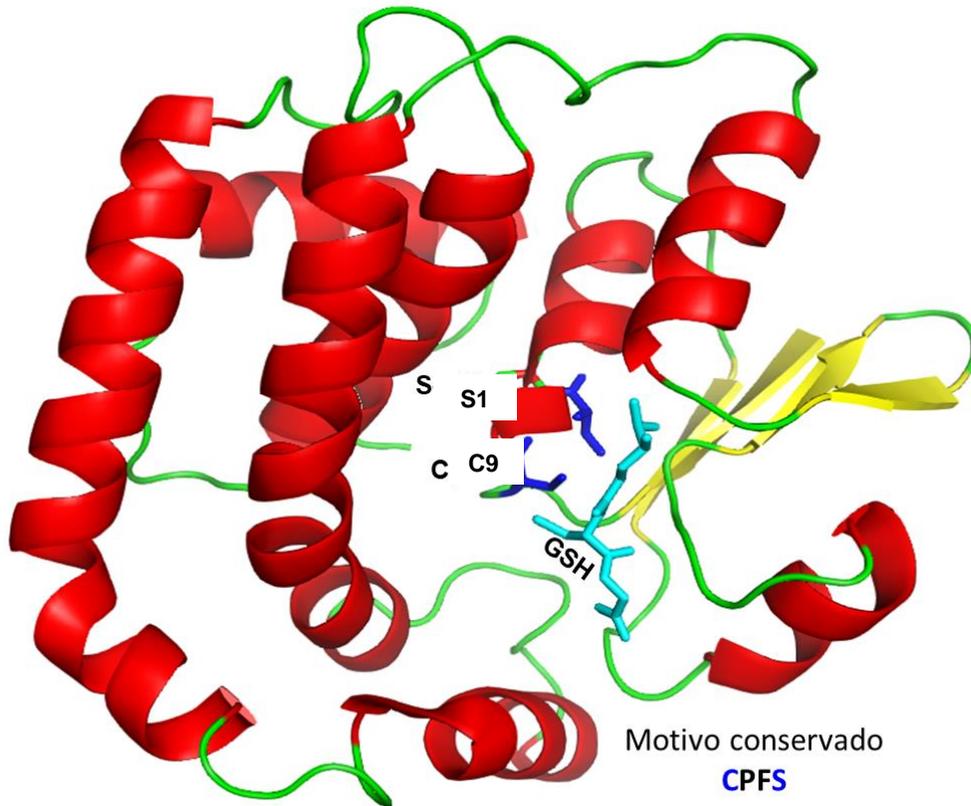
En la figura 16-A se observa el cromatograma por filtración en gel de VpGrx2, donde se presentó un pico mayoritario rodeado por otros dos de menor tamaño. Al analizar las fracciones por electroforesis en gel se logró una separación efectiva de la proteína de interés con respecto a

proteínas contaminantes. Así, la figura 16-B correspondiente a la electroforesis de las fracciones de la cromatografía, muestra la separación de las proteínas contaminantes en los carriles 1 – 5, mientras que la proteína de interés purificada se encontró exclusivamente en las fracciones del pico mayoritario.

Por otro lado, se construyó la curva estándar de filtración en gel para VpGrx2 y se observó que la proteína de interés eluyó en un volumen de 12.5 mL, correspondiente a un coeficiente de distribución ( $K_{av}$ ) de 0.287 (Valenzuela-Chavira *et al.*, 2017; Kasaai, 2018). A partir de estos valores se obtuvo un peso molecular aproximado de 27 kDa, correspondiente al monómero de VpGrx2.

### **6.3.3. Modelo 3D *in silico* de VpGrx2**

En conjunto con los experimentos *in vitro* de sobreexpresión y purificación de VpGrx2, se obtuvo por medio de Phyre2 un modelo *in silico* 3D estructural de la proteína, como se muestra en la figura 17. En dicho modelo se observa una estructura atípica de Grx, debido a que la secuencia y tamaño de la proteína exhibe una estructura terciaria formada por dos dominios. El primero se encuentra conformado por un plegamiento entre Grx y TRX (plegamiento tipo TRX – cuatro láminas  $\beta$  – color amarillo rodeadas por tres hélices  $\alpha$  – color rojo); mientras que el segundo dominio corresponde a un plegamiento tipo GST (cinco hélices  $\alpha$  – color rojo), confiriéndole un tamaño aproximado a la proteína de 27 kDa. Este es un tamaño atípico para las Grxs, las cuales presentan un tamaño aproximado de 9 – 15 kDa formadas por un plegamiento tipo TRX (Holmgren *et al.*, 2005; Lillig *et al.*, 2008). La figura 17 muestra los residuos catalíticos C9 y S12 presentes en el motivo conservado del sitio activo, así como el alineamiento del sustrato glutatión (GSH) en el modelo.



**Figura 17.** Modelo 3D estructural de VpGrx2 obtenido mediante Phyre2. Es posible observar a la C9 catalítica para la función antioxidante o tipo GRX, así como a la S12, envuelta posiblemente en la función alterna (bifuncional) detoxificante o tipo GST. Resaltado en color azul claro (aqua) una molécula de glutatión, la cual se acomoda en el espacio tridimensional de la cavidad (sitio activo) de VpGrx2.

El alineamiento de VpGrx2 con otras glutarredoxinas (figura 18), muestra que la cisteína del N-terminal es estrictamente conservada, independientemente si la proteína presenta una (monotiol) o dos (ditiol) cisteínas en el sitio activo, siendo ésta esencial para llevar a cabo la función redox (Herrero & Torre-Ruiz, 2007; Lillig *et al.*, 2008; Li & Outten, 2012). El sitio activo probable, presenta una secuencia con una única cisteína (CPPS) como se muestra en la figura 18, sin embargo, esto no concuerda con la secuencia canónica para Grxs mono o ditiólicas. El motivo canónico para las Grxs monotiólicas se compone de CGPS, de igual forma con una única cisteína presente en el N-terminal, mientras que las Grxs ditiólicas presentan una secuencia CPTC, lo que les confiere una mayor flexibilidad en el sitio activo (Lillig *et al.*, 2008; Berndt *et al.*, 2008).



**Figura 18.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de VpGrx2 frente a otras glutarredoxinas. Todas las Grxs sean monotiólicas (CXXS) o ditiólicas (CXXC) poseen un sitio activo (motivo) conservado. La Cys del N-terminal se encuentra presente en todas las Grxs. Donde se presenta una mayor divergencia es en el motivo monotiólico, como lo es VpGrx2.

Una vez que se obtuvo la proteína pura y se determinó su estado oligomérico, así como el modelo 3D de la misma, se prosiguió a realizar los experimentos de actividad específica. La VpGrx2 presenta una secuencia y estructura teórica atípica, como se describió anteriormente, la cual es similar a otra glutarredoxina 2 de *E. coli* (EcGrx2), con la que guarda un 51 % de identidad en su secuencia aminoacídica. Esta última, presenta una estructura y tamaño atípicos al igual que VpGrx2; ya que presenta un tamaño aproximado de 25.3 kDa, así como los dos dominios estructurales, uno tipo Grx y otro tipo GST. La EcGrx2 es una proteína bifuncional, ya que presenta actividad enzimática como transferasa o tipo GST además de su función antioxidante (Ye *et al.*, 2014). Es por ello que se evaluó la posible actividad alterna (bifuncional) (Moore, 2004; Huberts & van der Klei, 2010; Jeffery, 2014) de VpGrx2. De este modo se realizó un experimento de actividad específica tipo redox para Grxs (Holmgren & Aslund, 1995), así como otro ensayo de actividad específica tipo transferasa para GSTs (Habig *et al.*, 1974).

### 6.3.4. Actividad enzimática de VpGrx2

6.3.4.1. Actividad tipo GRX de VpGrx2. En el cuadro 3 se muestra la actividad específica tipo redox de VpGrx2 en comparación con otras Grxs. Lo primero que llama la atención es que el valor de actividad tipo redox de VpGrx2 es muy bajo en comparación con otras Grxs. Aunque hay otras Grxs con baja actividad tipo redox, como las Grxs 1 de glóbulos rojos o hepatocitos en el ser humano, éstas no son glutarredoxinas con una estructura atípica como lo son VpGrx2 y EcGrx2.

**Cuadro 3.** Actividad tipo GRX de VpGrx2 comparado con otras glutarredoxinas.

<b>Actividad específica tipo GRX</b>			
<b>Organismo</b>	<b>Proteína</b>	<b>UA/mg</b>	<b>Referencia</b>
<i>V. Parahaemolyticus</i>	<u>VpGrx2</u>	<u>0.002</u>	<u>Presente investigación</u>
<i>H. sapiens</i> – Glóbulos rojos	Grx1	0.005	Mieyal et al. 1991
<i>H. sapiens</i> – Hepatocitos	Grx1	0.075	Che-Jung et al., 1996
<i>C. aegagrus</i> – Timo	Grx	1.1	Luthman y Holmgren, 1982
<i>H. sapiens</i> – Mitocondrial	Grx2	25	Cian y Atkins., 2015
<i>H. sapiens</i> – Mitocondrial	Grx2	29	Gallogly et al., 2008
<i>H. sapiens</i> – Citosólica	Grx1	220	Cian y Atkins., 2015
<i>E. coli</i>	Grx2	220	Holmgren et al., 1995

Por otra parte, VpGrx2 manifestó una actividad mucho menor que EcGrx2 de hasta dos órdenes de magnitud por abajo de ésta última. Sin embargo, estos resultados son contrastantes cuando se observa la actividad enzimática como transferasa tipo GST de VpGrx2, tal como se observa en el cuadro 4.

6.3.4.2. Actividad tipo GST (híbrida) de VpGrx2. La actividad tipo GST de VpGrx2 como se muestra en el cuadro 4 es contrastante con los resultados de actividad tipo GRX en el cuadro 3, ya que la actividad enzimática como transferasa se asemeja más a las actividades de otras GSTs. Ambos resultados sugieren que VpGrx2 es más activa como enzima que como proteína redox.

**Cuadro 4.** Actividad enzimática tipo GST de VpGrx2 comparado con otras GSTs.

Organismo	Actividad específica tipo GST		Referencia
	Proteína	UA/mg	
<i>A. fumigatus</i>	GST	0.025	Burns et al., 2005
<i>E. coli</i>	GST	0.52	Arca et al., 1990
<i>R. rattus</i> – Hígado	GST	4.3	Habig et al., 1974
<i>V. parahaemolyticus</i>	<u>VpGrx2</u>	<u>4.6</u>	<u>Presente investigación</u>
<i>V. parahaemolyticus</i>	GST	5.6	Valenzuela-Chavira et al., 2017
<i>H. Sapiens</i> – Gliomas	GST- $\pi$	50	Ali-Osman et al., 2008
<i>L. vannamei</i>	GST- $\mu$	440	Contreras-Vergara et al., 2007

En este estudio se sugiere que los resultados atípicos son debido las características únicas de la VpGrx2, incluyendo el motivo del sitio activo conservado (CxxS) (figura 17), distinto a otras Grxs (figura 18), lo que le permite llevar a cabo ambas funciones, tanto redox como catalítica (transferasa). La cisteína es necesaria para la función redox (Gallogly *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2014), mientras que la serina es necesaria para la actividad catalítica tipo GST (Contreras-Vergara *et al.*, 2004; Kalinina *et al.*, 2014; Valenzuela-Chavira *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos muestran que la VpGrx2 es una proteína bifuncional, ya que presenta actividad tanto antioxidante como transferasa, similar a lo que ocurre con la glutaredoxina 2 de *E. coli* (Ashiuchi *et al.*, 2002).

Es así como esta primera aproximación en la caracterización de VpGrx2 facilitará los estudios bioquímicos y biofísicos posteriores de la proteína, lo cual contribuirá a comprender de mejor manera los mecanismos de defensa de *V. parahaemolyticus*. De esta manera, será posible en un futuro a mediano y largo plazo, diseñar fármacos o inhibidores específicos que permitan contrarrestar el crecimiento y desarrollo de dicho organismo.

## 7. CONCLUSIONES

La enzima VpGluR se sobreexpresó de manera insoluble en cuerpos de inclusión y se replegó de manera *in vitro*, sin embargo, ésta no presentó actividad. El modelo 3D estructural permitió obtener una mejor comprensión de la estructura, así como los residuos catalíticos del sitio activo. También fue posible caracterizar estructuralmente al sustrato de VpGluR o glutamato mediante cristalografía y difracción de rayos X, el cual cristalizó con un átomo de cloro en la estructura (D-Glu:Cl), lo que generó un ligero cambio en la posición del rotámero del aminoácido. De esta forma se logró identificar y asignar de manera correcta e inequívoca la configuración absoluta del compuesto como D-Glu(R), lo cual es esencial para el diseño y desarrollo de inhibidores o análogos del sustrato a mediano y largo plazo.

En la misma perspectiva, se estudió y caracterizó de manera *in vitro* a la proteína VpGrx2, la cual se obtuvo de manera soluble y activa, ésta fue purificada y determinado su estado oligomérico como monómero. La caracterización bioquímica de VpGrx2 permitió establecer que es una proteína bifuncional, la cual presentó una mayor actividad enzimática tipo GST (transferasa) que tipo GRX (redox). Esta dualidad de funciones en VpGrx2 favorece la adaptación de la bacteria ante las condiciones de estrés oxidativo, así como para la excreción de desechos celulares.

Con el enfoque de la búsqueda de moléculas que puedan ser inhibidoras de proteínas blanco, como la VpGluR o VpGrx2, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que: la molécula más prometedora para tal fin es el D-Glu:Cl(R), el cual es factible cristalizar, difractar y determinar su configuración absoluta; para posteriormente estudiar los posibles cambios o modificaciones sobre la molécula, de tal forma que permitan que ésta cumpla la función como un inhibidor análogo. Con respecto a las proteínas, la VpGrx2 es una proteína redox con mayor factibilidad para llevar a cabo su caracterización estructural, ya que ésta es una proteína soluble y activa lo facilita los análisis *in vitro*. Para realizar estos mismos estudios en la VpGluR es necesario invertir una mayor cantidad de recursos ya que ésta proteína se sobreexpresó de manera insoluble, lo que demora su caracterización.

En conjunto, la investigación sobre VpGluR, D-Glu:Cl(R) y VpGrx2, permitirá entender y

comprender de mejor manera los mecanismos de defensa de *V. parahaemolyticus*. Con lo que se busca a futuro poder contrarrestar sus efectos negativos cuando se presenta una infección o en su defecto, prevenir con anticipación problemas de salud y/o comerciales en la acuicultura del camarón.

## 8. RECOMENDACIONES

Como resultado del presente estudio, se recomienda continuar con el estudio de VpGluR, llevando a cabo experimentos que permitan la correcta identificación de la proteína de interés. Uno de los experimentos que permitirían confirmar la identidad de VpGluR, ya que ésta no presentó actividad bajo las condiciones experimentales en el presente estudio, es el análisis de secuenciación mediante espectrometría de masas a partir de la proteína purificada, con la cual se obtendría la identificación certera de la enzima. Otro experimento viable para constatar que la proteína purificada es en verdad VpGluR, es a través de un western-blot con anticuerpos específicos para la enzima de interés. Estos dos experimentos demostrarían que la proteína en estudio es verdaderamente VpGluR. Por otra parte, para corroborar el estado oligomérico la enzima, sería recomendable realizar un experimento de electroforesis en gel de poliacrilamida nativo (PAGE), por lo que se confirmaría si la enzima VpGluR presenta una estructura monomérica o dimérica. Posterior a dichos análisis, se recomienda continuar con la caracterización biofísica y bioquímica de la enzima por medio de la cristalización y difracción de rayos X, así como realizar los ensayos de cinética enzimática.

Con respecto al compuesto D-Glu:Cl(R) se recomienda continuar con la co-cristalización del sustrato junto con VpGluR para dilucidar los residuos específicos de la enzima que entran en contacto con el D-Glu, así como conocer las interacciones químicas entre ambas moléculas. Esto permitirá continuar en la búsqueda y diseño de inhibidores específicos o análogos para VpGluR, así como una mejor comprensión del mecanismo catalítico de la enzima.

Finalmente, para continuar con el análisis de la proteína redox VpGrx2, se sugiere su caracterización estructural experimental mediante la cristalización y difracción de rayos X de VpGrx2. Lo anterior tanto en forma apo como holo (VpGrx2+GSH) para esclarecer los residuos específicos que intervienen en la interacción entre la proteína y el sustrato, así como los encargados de la catálisis. Con respecto a esto último, se recomienda llevar a cabo experimentos de mutación dirigida (Rouhier *et al.*, 2002; Packer & Liu, 2015; Valenzuela-Chavira *et al.*, 2017), para conocer con exactitud los residuos catalíticos. Sí al hacer esto se cambia un residuo esencial para la función, por ejemplo C9A, es posible que pierda la función redox completamente; de manera similar si se

muta S12A, provocando que la proteína sea inactiva. Estos resultados junto con los de cristalografía confirmarían de manera complementaria como está funcionando VpGrx2 y con qué residuos específicamente. Por otra parte, resultaría muy interesante el conocer si existe un traslape de funciones entre las GSTs y Grxs de *V. parahaemolyticus*, como se ha visto en *S. cerevisiae* (Collinson & Grant, 2003; Garcerá *et al.*, 2006). Para ello se necesitaría contar con cepas mutantes de *V. parahaemolyticus* de cada uno de los genes para las distintas Grxs y GSTs presentes en el genoma (Gomez-Jimenez *et al.*, 2014). Para posteriormente retar a las cepas deletadas contra diversos factores de estrés como choque térmico, oxidativo o xenobióticos (CDNB) (Kalinina *et al.*, 2014).

## 9. REFERENCIAS

- Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J. G., Pérez-Castañeda, R., Palacios-Monzón, A., Trujillo-Rodríguez, T. & de la Cruz-Hernández, N. I. (2010). *J. World Aquac. Soc.* **41**, 464–470.
- Andel, O. M. V (1966). *Annu. Rev. Phytopathol.* **4**, 349–368.
- Anfinsen, C. B. (1973). *Science (80-. )*. **181**, 223–230.
- Arthur, M. (2016). *Trends Microbiol.* **24**, 519–521.
- Ashiuchi, M., Kuwana, E., Yamamoto, T., Komatsu, K., Soda, K. & Misono, H. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 39070–39073.
- Ashiuchi, M., Yamamoto, T. & Kamei, T. (2013). *Life*. **3**, 181–188.
- Ashrafudoulla, M., Furkanur Rahaman Mizan, M., Park, H., Byun, K. H., Lee, N., Park, S. H. & Ha, S. Do (2019). *Front. Microbiol.* **10**, 513.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. & Zagnitko, O. (2008). *BMC Genomics*. **9**, 75.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. & Mori, H. (2006). *Mol. Syst. Biol.* **2**.
- Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004). *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399–1407.
- Barrow, M. V., Steffek, A. J. & King, C. T. G. (1969). *Folia Primatol.* **10**, 195–203.
- Berndt, C., Lillig, C. H. & Holmgren, A. (2008). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1783**, 641–650.
- Bertani, G. (1951). *J. Bacteriol.* **62**, 293–300.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. & Schäfer, F. (2009). *Methods Enzymol.* **463**, 439–473.
- Böhmer, N., Dautel, A., Eisele, T. & Fischer, L. (2013). *Protein Expr. Purif.* **88**, 54–60.
- Bondos, S. E. & Bicknell, A. (2003). *Anal. Biochem.* **316**, 223–231.
- Bredikhin, A. A., Bredikhina, Z. A., Kurenkov, A. V. & Gubaidullin, A. T. (2017). *Tetrahedron Asymmetry*. **28**, 1359–1366.
- Bruker (2014). *Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA*.
- Burgess, R. R. (2009). *Methods in Enzymology*, Vol. 463, pp. 259–282. Academic Press.
- Cahn, R. S., Ingold, C. K. & Prelog, V. (1956). *Experientia*. **12**, 81–94.
- Carrasco-Miranda, J. S., Lopez-Zavala, A. A., Arvizu-Flores, A. A., Garcia-Orozco, K. D., Stojanoff, V., Rudiño-Piñera, E., Brieba, L. G. & Sotelo-Mundo, R. R. (2014). *PLoS One*. **9**, e94369.

- Ceccarelli, D., Hasan, N. A., Huq, A. & Colwell, R. R. (2013). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 97.
- Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W. & Wang, H. C. (2017). *Sci. Rep.* **7**, 9395.
- Choi, S.-Y., Esaki, N., Yoshimura, T. & Soda, K. (1991). *Protein Expr. Purif.* **2**, 90–93.
- Choi, S. Y., Esaki, N., Ashiuchi, M., Yoshimura, T. & Soda, K. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10144–10147.
- Claus, H. & König, H. (2010). *Prokaryotic Cell Wall Compounds: Structure and Biochemistry*, Vol. pp. 231–251. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Coligan, J. E. (2003). Short protocols in protein science: a compendium of methods from Current protocols in protein science John Wiley & Sons Inc.
- Collin, F., Karkare, S. & Maxwell, A. (2011). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 479–497.
- Collinson, E. J. & Grant, C. M. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 22492–22497.
- Conti, P., Tamborini, L., Pinto, A., Blondel, A., Minoprio, P., Mozzarelli, A. & De Micheli, C. (2011). *Chem. Rev.* **111**, 6919–6946.
- Contreras-Vergara, C. A., Harris-Valle, C., Sotelo-Mundo, R. R. & Yepiz-Plascencia, G. (2004). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **18**, 245–252.
- Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R., Briebe, L. G., Viana, M. T., Sotelo-Mundo, R. R. & Ochoa-Leyva, A. (2017). *Sci. Rep.* **7**, 11783.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D. & Milzani, A. (2009). *Trends Biochem. Sci.* **34**, 85–96.
- Dean, S. F., Whalen, K. L. & Spies, M. A. (2015). *ACS Cent. Sci.* **1**, 364–373.
- Delfino, M., Loiacono, G. & Nicolosi, J. (1978). *J. Solid State Chem.*
- Deneke, S. & Fanburg, B. (1989). *Cell. Mol. Physiol.*
- De Dios, A., Prieto, L., Martín, J. A., Rubio, A., Ezquerra, J., Tebbe, M., López De Uralde, B., Martín, J., Sánchez, A., LeTourneau, D. L., McGee, J. E., Boylan, C., Parr, T. R. & Smith, M. C. (2002). *J. Med. Chem.* **45**, 4559–4570.
- Doublet, P., van Heijenoort, J., Bohin, J. P. & Mengin-Lecreulx, D. (1993). *J. Bacteriol.* **175**, 2970–2979.
- Doublet, P., van Heijenoort, J. & Mengin-Lecreulx, D. (1994). *Biochemistry.* **33**, 5285–5290.
- Doublet, P., Van Heijenoort, J. & Mengin-Lecreulx, D. (1992). *J. Bacteriol.* **174**, 5772–5779.
- Doublet, P., Van Heijenoort, J. & Mengin-Lecreulx, D. (1996). *Microb. Drug Resist.* **2**, 43–49.
- Elmahdi, S., DaSilva, L. V. & Parveen, S. (2016). *Food Microbiol.* **57**, 128–134.
- Englander, S. W. & Mayne, L. (2014). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 15873–15880.
- Espaillet, A., Carrasco-López, C., Bernardo-García, N., Pietrosemoli, N., Otero, L. H., Álvarez, L., de Pedro, M. A., Pazos, F., Davis, B. M., Waldor, M. K., Hermoso, J. A., Cava, F. & IUCr (2014). *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **70**, 79–90.
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F. & Collet, J.-F. (2017). *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 385–396.

- Fan, Y. Y., Chen, S. X., Liu, Q. F., Gan, L. S. & Yue, J. M. (2017). *Tetrahedron Lett.* **58**, 4728–4730.
- Farrugia, L. J. (2012). *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 849–854.
- Fernandes, A. P. & Holmgren, A. (2004). *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 63–74.
- Fisher, S. L. (2008). *Microb. Biotechnol.* **1**, 345–360.
- Flack, H. D. (1983). *Acta Crystallogr. Sect. A.* **39**, 876–881.
- Flack, H. D. & Bernardinelli, G. (2008). *Chirality.* **20**, 681–690.
- Fontecave, M. (2006). *Nat. Chem. Biol.* **2**, 171–174.
- Fox-Uribe, L. Y., Hernández-Paredes, J., Soberanes, Y., Valenzuela-Chavira, I., Garcia-Orozco, K. D., Ochoa-Leyva, A., Lara, K. O., Navarro, R. E., Sotelo-Mundo, R. R. & IUCr (2019). *IUCrData.* **4**, x190458.
- Fox-Uribe, L. Y., Soberanes, Y., Guzman-Luna, V., Saab-Rincon, G., Hernández-Paredes, J. & Sotelo-Mundo, R. R. (2017). *Microsc. Microanal.* **23**, 1382–1383.
- Fun, H. K., Chantrapromma, S., Yodsaoue, O. & Karalai, C. (2010). *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* **66**,.
- Fun, H. K., Siridechakorn, I., Laphookhieo, S. & Chantrapromma, S. (2011). *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* **67**,.
- Galal, A. M. F., Shalaby, E. M., Abouelsayed, A., Ibrahim, M. A., Al-Ashkar, E. & Hanna, A. G. (2018). *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **188**, 213–221.
- Galleguillos, M., Plaza De Los Reyes, R., Kessi, E., González, E., Letelier, M. E., Valdivia, G. & Adarmes, H. (2012). *Arch. Med. Vet.* **44**, 179–183.
- Gallo, K. A. & Knowles, J. R. (1993). *Biochemistry.* **32**, 3981–3990.
- Gallo, K. A., Tanner, M. E. & Knowles, J. R. (1993a). *Biochemistry.* **32**, 3991–3997.
- Gallo, K. A., Tanner, M. E. & Knowles, J. R. (1993b). *Biochemistry.* **32**, 3991–3997.
- Gallogly, M. M., Starke, D. W. & Mieyal, J. J. (2009). *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1059–1081.
- Garcerá, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J. & Herrero, E. (2006). *Biochem. J.* **398**, 187–196.
- García-Orozco, K. D., López-Zavala, A. A., Puentes-Camacho, D., Calderón-De-La-Barca, A. M. & Sotelo-Mundo, R. R. (2005). *Biotechnol. Lett.* **27**, 1075–1080.
- Geng, B., Basarab, G., Comita-Prevoir, J., Gowravaram, M., Hill, P., Kiely, A., Loch, J., MacPherson, L., Morningstar, M., Mullen, G., Osimboni, E., Satz, A., Eyermann, C. & Lundqvist, T. (2009). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 930–936.
- Ghenem, L., Elhadi, N., Alzahrani, F. & Nishibuchi, M. (2017). *Saudi J. Med. Med. Sci.* **5**, 93–103.
- Giddings, J. C. & Mallik, K. L. (1966). *Anal. Chem.* **38**, 997–1000.
- Glavas, S. & Tanner, M. E. (1997). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2265–2270.
- Glavas, S. & Tanner, M. E. (2001). *Biochemistry.* **40**, 6199–6204.
- Gomez-Jimenez, S., Noriega-Orozco, L., Sotelo-Mundo, R. R., Cantu-Robles, V. A., Cobian-

- Guemes, A. G., Cota-Verdugo, R. G., Gamez-Alejo, L. A., del Pozo-Yauner, L., Guevara-Hernandez, E., Garcia-Orozco, K. D., Lopez-Zavala, A. A. & Ochoa-Leyva, A. (2014). *Genome Announc.* **2**, e00800-14.
- Goodall, E. C. A., Robinson, A., Johnston, I. G., Jabbari, S., Turner, K. A., Cunningham, A. F., Lund, P. A., Cole, J. A. & Henderson, I. R. (2018). *MBio.* **9**,.
- Govea, A. D. V. (2010). *Springer Tracts in Advanced Robotics*, Vol. 64, pp. 45–68. Academic Press.
- Grek, C. L., Zhang, J., Manevich, Y., Townsend, D. M. & Tew, K. D. (2013). *J. Biol. Chem.* **288**, 26497–26504.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. (1974). *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139.
- Hald, E., Lehmann, P. & Ziegenhorn, J. (1975). *Clin. Chem.* **21**,.
- Healthcare, G. E. Instructions 71-5027-68 AF HisTrap affinity columns Chicago, USA.
- Heijenoort, J. van (2001). *Nat. Prod. Rep.* **18**, 503–519.
- Herrero, E. & Torre-Ruiz, M. (2007). *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 1518–1530.
- Hirayama, N., Shirahata, K. & Ohashi, Y. (1980). *Bull. Chem.*
- Hirokawa, S. (1955). *Acta Crystallogr.*
- Holmgren, A. (1988).
- Holmgren, A. & Aslund, F. (1995). *Methods Enzymol.* **252**, 264–274.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M. E., Hudemann, C. & Lillig, C. H. (2005). *Biochemical Society Transactions*, Vol. 33, pp. 1375–1377.
- Hooft, R. W. W., Straver, L. H. & Spek, A. L. (2008). *J. Appl. Crystallogr.* **41**, 96–103.
- Howland, J. L. (1996). *Biochem. Educ.* **24**, 68.
- Huberts, D. H. E. W. & van der Klei, I. J. (2010). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1803**, 520–525.
- Hwang, K. Y., Cho, C. S., Sang Suk Kim, Sung, H. C., Yeon Gyu Yu & Cho, Y. (1999). *Nat. Struct. Biol.* **6**, 422–426.
- Integrated DNA Technologies, I. (IDT) Integrated DNA Technologies | Your advocate for the genomics age.
- Israyilova, A., Buroni, S., Forneris, F., Scoffone, V. C., Shixaliyev, N. Q., Riccardi, G. & Chiarelli, L. R. (2016). *PLoS One.* **11**, e0167350.
- Jancarik, J. & Kim, S. H. (1991). *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 409–411.
- Jeffery, C. J. (2014). *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1679–1683.
- Jeffery, C. J. (2016). *J. Proteomics.* **134**, 19–24.
- Jiang, M. & Fang, Q. (1999). *Adv. Mater.* **11**, 1147–1151.
- Jiang, Z.-P., Tian, L.-W., Shen, L. & Wu, J. (2018). *Fitoterapia.* **130**, 272–280.
- Jilek, A. & Kreil, G. (2008). *Monatshefte Fur Chemie.* **139**, 1–5.
- Kalinina, E. V., Chernov, N. N. & Novichkova, M. D. (2014). *Biochem.* **79**, 1562–1583.

- Kane, J. F. & Hartley, D. L. (1988). *Trends Biotechnol.* **6**, 95–101.
- Kasaai, M. R. (2018). *J. Polym. Biopolym. Phys. Chem.* **6**, 39–44.
- Kee, C.-L., Chin, L.-C., Cheah, N.-P., Ge, X. & Low, M.-Y. (2019). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **173**, 47–55.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. E. (2015). *Nat. Protoc.* **10**, 845–858.
- Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. E. (2009). *Nat. Protoc.* **4**, 363–373.
- Kim, K. H., Bong, Y. J., Park, J. K., Shin, K. J., Hwang, K. Y. & Kim, E. E. K. (2007). *J. Mol. Biol.* **372**, 434–443.
- Kirfel, A. & Wallrafen, F. (1985). *Zeitschrift Für Krist. - Cryst. Mater.* **171**, 121–128.
- Kivikoski, J. H., Rissanen, K. T. & Parhi, S. S. L. (1993). *Tetrahedron: Asymmetry.* **4**, 45–58.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature.* **227**, 680–685.
- Laurent, T. C. & Killander, J. (1964). *J. Chromatogr. A.* **14**, 317–330.
- Lee, C. Te, Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C. Y., Lin, S. S., Lightner, D. V., Wang, H. C., Wang, A. H. J., Wang, H. C., Hor, L. I. & Lo, C. F. (2015). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 10798–10803.
- Lee, K. S., Park, S. M., Hwang, K. Y. & Chi, Y. M. (2005). *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**, 199–201.
- Lehmann, M. S., Koetzle, T. F. & Hamilton, W. C. (1972). *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 2657–2660.
- Lehmann, M. S. & Nunes, A. C. (1980). *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **36**, 1621–1625.
- Li, H. & Outten, C. E. (2012). *Biochemistry.* **51**, 4377–4389.
- Li, X. X., Xu, X. D., Dan, Y. Y. & Zhang, M. L. (2008). *Crystallogr. Reports.* **53**, 1261–1266.
- Li, Y., Mortuza, R., Milligan, D. L., Tran, S. L., Strych, U., Cook, G. M. & Krause, K. L. (2014). *J. Bacteriol.* **196**, 4239–4244.
- Lillig, C. H. & Berndt, C. (2013). *Antioxidants Redox Signal.* **18**, 1654–1665.
- Lillig, C. H., Berndt, C. & Holmgren, A. (2008). *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1780**, 1304–1317.
- Lim, J. G. & Choi, S. H. (2014). *Infect. Immun.* **82**, 569–578.
- Liu, W. Q., Lai, F. F., Zhang, J., Sheng, L., Li, Y., Li, L. & Chen, X. G. (2018). *Tetrahedron.* **74**, 3045–3051.
- Loi, V. Van, Rossius, M. & Antelmann, H. (2015). *Front. Microbiol.* **6**, 187.
- López-Zavala, A. A., García-Orozco, K. D., Carrasco-Miranda, J. S., Sugich-Miranda, R., Velázquez-Contreras, E. F., Criscitiello, M. F., Brieba, L. G., Rudiño-Piñera, E. & Sotelo-Mundo, R. R. (2013). *J. Bioenerg. Biomembr.* **45**, 511–518.
- López-Zavala, A. A., Quintero-Reyes, I. E., Carrasco-Miranda, J. S., Stojanoff, V., Weichsel, A., Rudiño-Piñera, E., Sotelo-Mundo, R. R. & IUCr (2014). *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **70**, 1150–1154.

- Lundqvist, T., Fisher, S. L., Kern, G., Folmer, R. H. A., Xue, Y., Newton, D. T., Keating, T. A., Alm, R. A. & de Jonge, B. L. M. (2007). *Nature*. **447**, 817–822.
- Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Rodrigues-Monge, L., Taylor, R., van de Streek, J. & Wood, P. A. (2008). *J. Appl. Cryst.* **41**, 466–470.
- Maity, H., Maity, M., Krishna, M. M. G., Mayne, L. & Englander, S. W. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4741–4746.
- Marcoin, W., Duda, H., Kusz, J., Bzowski, B. & Warczewski, J. (1999). *Proceedings of the 17th Applied Crystallography Conference*, Vol. p. 40. World Science Wisła, Poland.
- Martin, J. L. (1995). *Structure*. **3**, 245–250.
- Masi, M., Cimmino, A., Maddau, L., Kornienko, A., Tuzi, A. & Evidente, A. (2016). *Tetrahedron Lett.* **57**, 4592–4594.
- May, M., Mehboob, S., Mulhearn, D. C., Wang, Z., Yu, H., Thatcher, G. R. J., Santarsiero, B. D., Johnson, M. E. & Mesecar, A. D. (2007). *J. Mol. Biol.* **371**, 1219–1237.
- Mehboob, S., Guo, L., Fu, W., Mittal, A., Yau, T., Truong, K., Johlfs, M., Long, F., Fung, L. W.-M. & Johnson, M. E. (2009). *Biochemistry*. **48**, 7045–7055.
- Meyer, Y., Buchanan, B. B., Vignols, F. & Reichheld, J.-P. (2009). *Annu. Rev. Genet.* **43**, 335–367.
- Mondal, S., Naubron, J.-V., Campolo, D., Giorgi, M., Bertrand, M. P. & Nechab, M. (2013). *Chirality*. **25**, 832–839.
- Moore, B. D. (2004). *Trends Plant Sci.* **9**, 221–228.
- Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J. R., Uzarska, M. A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lillig, C. H. & Lill, R. (2010). *Cell Metab.* **12**, 373–385.
- Murakami, S., Kato, A., Katagiri, H., Matsumoto, T. & Kijima, T. (2010). *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online*. **66**, o1677–o1677.
- Nawrocki, J. P., Chu, R. A., Pannell, L. K. & Bai, Y. (1999). *J. Mol. Biol.* **293**, 991–995.
- Nilsson, J., Jonasson, P., Samuelsson, E., Ståhl, S. & Uhlén, M. (1996). *J. Biotechnol.* **48**, 241–250.
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C. & Gomez-Jimenez, S. (2014). *Dis. Aquat. Organ.* **111**, 81–86.
- Ortega, H. E., Batista, J. M., Melo, W. G. P., Clardy, J. & Pupo, M. T. (2017). *Tetrahedron Lett.* **58**, 4721–4723.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F. & Stevens, R. (2014). *Nucleic Acids Res.* **42**, D206–D214.
- Packer, M. S. & Liu, D. R. (2015). *Nat. Rev. Genet.* **16**, 379–394.
- Pal, M. & Bearne, S. L. (2014). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 1432–1436.
- Papaseit, E., García-Algar, O. & Farré, M. (2013). *An. Pediatria.* **78**, 283–287.
- Parsons, S., Flack, H. D. & Wagner, T. (2013). *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **69**, 249–259.
- Ramón, A., Señorale-Pose, M. & Marín, M. (2014). *Front. Microbiol.* **5**, 777–788.

- Rinas, U., Garcia-Fruitós, E., Corchero, J. L., Vázquez, E., Seras-Franzoso, J. & Villaverde, A. (2017). *Trends Biochem. Sci.* **42**, 726–737.
- Roder, H., Elöve, G. A. & Englander, S. W. (1988). *Nature*. **335**, 700–704.
- Rouhier, N., Gelhaye, E. & Jacquot, J.-P. (2002). *FEBS Lett.* **511**, 145–149.
- Rupp, B. (2009). *Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology* Garland Science.
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I. & Overington, J. P. (2017). *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 19–34.
- Sargent, T. (2004). *Anal. Biochem.* **171**, 223–224.
- Schrödinger, LLC (2015a). The {JyMOL} Molecular Graphics Development Component, Version~1.8.
- Schrödinger, LLC (2015b). The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~1.8.
- Sengupta, S., Ghosh, S. & Nagaraja, V. (2008). *Microbiology*. **154**, 2796–2803.
- Sheldrick, G. (2008). *Acta Crystallogr. Sect. A Found.*
- Sheldrick, G. M. (2015). *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* **71**, 3–8.
- Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. (2010). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000414.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M. & Panda, A. K. (2015). *Microb. Cell Fact.* **14**, 41.
- Sleytr, U. B., Egelseer, E.-M., Ilk, N., Messner, P., Schäffer, C., Pum, D. & Schuster, B. (2010). *Prokaryotic Cell Wall Compounds*, Vol. pp. 459–481. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Soda, K. (2006). *Viva Orig.* **34**, 81–85.
- Sørensen, H. P. & Mortensen, K. K. (2005). *J. Biotechnol.* **115**, 113–128.
- Spek, A. L. (2003). *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 7–13.
- Spek, A. L. (2009). *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **65**, 148–155.
- Spies, M. A., Reese, J. G., Dodd, D., Pankow, K. L., Blanke, S. R. & Baudry, J. (2009). *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5274–5284.
- Strakova, I., Kumpia, I., Rjabovs, V., Lugiina, J., Belyakov, S. & Turks, M. (2011). *Tetrahedron Asymmetry*. **22**, 728–739.
- Stroeher, E. & Millar, A. H. (2012). *Biochem. J.* **446**, 333–348.
- Tate, S. S. & Meister, A. (1981a). **1**, 357–368.
- Tate, S. S. & Meister, A. (1981b). *The Biological Effects of Glutamic Acid and Its Derivatives*, Vol. pp. 357–368. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Tilborg, A., Norberg, B. & Wouters, J. (2014). *Eur. J. Med. Chem.* **74**, 411–426.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K. & Lightner, D. V. (2013). *Dis. Aquat. Organ.* **105**, 45–55.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. & Arakawa, T. (2003). *Protein Expr. Purif.* **28**, 1–8.

- Tyedmers, J., Mogk, A. & Bukau, B. (2010). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 777–788.
- Urquhart, E. A., Jones, S. H., Yu, J. W., Schuster, B. M., Marcinkiewicz, A. L., Whistler, C. A. & Cooper, V. S. (2016). *PLoS One.* **11**, e0155018.
- Valenzuela-Chavira, I. (2018). Estudios estructurales de Glutación S-transferasa de eucariotas y procariotas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD).
- Valenzuela-Chavira, I., Contreras-Vergara, C. A., Arvizu-Flores, A. A., Serrano-Posada, H., Lopez-Zavala, A. A., García-Orozco, K. D., Hernandez-Paredes, J., Rudiño-Piñera, E., Stojanoff, V., Sotelo-Mundo, R. R. & Islas-Osuna, M. A. (2017). *Biochimie.* **135**, 35–45.
- Vlamiš-Gardikas, A., Aslund, F., Spyrou, G., Bergman, T. & Holmgren, A. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 11236–11243.
- Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M. A. (2008). *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 149–167.
- Whalen, K. L., Pankow, K. L., Blanke, S. R. & Spies, M. A. (2010). *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 9–13.
- Whalen, K. L., Tussey, K. B., Blanke, S. R. & Spies, M. A. (2011). *J. Phys. Chem. B.* **115**, 3416–3424.
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S. & Wang, Y. (2017). *Sci. Rep.* **7**, 42177.
- Yamaguchi, H. & Miyazaki, M. (2014). *Biomolecules.* **4**, 235–251.
- Ye, J., Nadar, S. V., Li, J. & Rosen, B. P. (2014). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **70**, 1907–1913.
- Yuasa, N., Koyama, T. & Fujita-Yamaguchi, Y. (2014). *Biosci. Trends.* **8**, 24–31.
- Zaffagnini, M., Michelet, L., Massot, V., Trost, P. & Lemaire, S. D. (2008). *J. Biol. Chem.* **283**, 8868–8876.
- Zhou, Y.-T., Ren, X. & Li, Y. (2018). *IUCrData.* **3**, x180586.
- Ziegenhorn, J., Senn, M. & Bücher, T. (1976). *Clin. Chem.* **22**,.
- Zlotos, D. P., Mohsen, A. M. Y., Mandour, Y. M., Marzouk, M. A., Breitingner, U., Villmann, C., Breitingner, H.-G., Sotriffer, C., Jensen, A. A. & Holzgrabe, U. (2019). *J. Nat. Prod.* **82**, 2332–2336.

## 10. APÉNDICES

### 10.1. Apéndice A – VpGluR: Preparación de soluciones y medios

#### **Medio SOC:**

Medio utilizado durante el protocolo de transformación de VpGluR-ADNp en *E. coli*. Para preparar de 20 ml se necesita: 0.4 g Triptona, 0.1 g Extracto de levadura, 0.072 g Glucosa, 0.00372 g de KCl, 0.01 g NaCl, 0.0192 g MgCl<sub>2</sub>. Se esteriliza una vez preparado el medio de cultivo durante 15 min a 121° C y 15 lb de presión.

#### **Agar LB:**

Medio sólido utilizado para la selección de bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido de interés de VpGluR. Para 100 ml de medio se necesita: 0.1 g Triptona, 0.5 g Extracto de levadura, 0.1 g NaCl, 2% agar. Se esteriliza el medio una vez preparado y se vacía en placa para su solidificación.

#### **Medio LB:**

Medio utilizado tanto para el crecimiento bacteriano como durante la sobreexpresión de VpGluR. Para preparar 1 L de cultivo se necesita: 10 g Triptona, 5 g Extracto de levadura, 10 g NaCl. Se esteriliza el medio una vez preparado.

#### **Solución Salina:**

Solución utilizada para lavado de biomasa proveniente de la sobreexpresión de la proteína. Su preparación consiste en: 0.9 g de NaCl disueltos en 100 ml de agua ultra-pura (Milli-Q®). Dicha solución se esteriliza una vez preparada.

#### **Solución de Lisis:**

Solución utilizada en la lisis bacteriana durante la sonicación. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, 0.5mM Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 5 mM Benzamidina, 1 mM Ditioneitol (DTT), pH 8.0. Esta solución se prepara al momento de su uso. El DTT se agrega en fresco justo al momento de la lisis.

#### **Solución de Lavado 1:**

Solución utilizada durante la preparación/extracción de los cuerpos de inclusión de VpGluR. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, 5mM DTT, 2% Tritón X-100, 5 mM Ácido

etilendiaminotetraacético (EDTA), pH 8.0. Se prepara un volumen de 20 ml para usos posteriores. El DTT se agrega en fresco al momento de su uso.

**Solución de Lavado 2:**

Solución utilizada durante la preparación/extracción de los cuerpos de inclusión de VpGluR. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, 5mM DTT, 5 mM EDTA, pH 8.0. Se prepara un volumen de 40 ml para usos posteriores. El DTT se agrega en fresco al momento de su uso.

**Solución de Extracción:**

Solución utilizada durante la preparación/extracción de los cuerpos de inclusión de VpGluR. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, 5mM DTT, 5 mM EDTA, 8 M Urea, pH 8.0. Se prepara un volumen de 20 ml para usos posteriores. El DTT se agrega en fresco al momento de su uso.

**Solución de Replegamiento:**

Solución utilizada para el replegamiento *in vitro* de VpGluR. Se compone de: 50 mM Tris-HCl, 10% Glucosa, 1 mM EDTA, 0.1 mM Glutación Reducido (GSH), 0.01mM Glutación Oxidado (GSSG), pH 8.0. Se preparan aproximadamente 50 ml para su uso inmediato. Los agentes reductores y oxidantes (GSH y GSSG) se agregan a la solución en fresco.

**Solución de Unión (A):**

Solución utilizada durante la purificación de VpGluR por IMAC. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, 0.25 M NaCl, 2 M Urea, 0.5 mM Fosfato de Tris(2-cloroetil) (TCEP), pH 8.0. Se prepara 750 ml de solución sin agente reductor, el cual se agrega en fresco al momento de su uso. Una vez preparada se filtra y desgasifica para su uso en el equipo cromatográfico.

**Solución de Elución (B):**

Solución utilizada durante la purificación de VpGluR por IMAC. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, 0.25 M NaCl, 2 M Urea, 0.5 mM TCEP, 500 mM Imidazol, pH 8.0. Se prepara 400 ml de solución sin agente reductor, el cual se agrega en fresco al momento de su uso. Una vez preparada se filtra y desgasifica.

**Solución Amortiguadora VpGluR:**

Solución amortiguadora para VpGluR, se utiliza durante la diálisis de la proteína previo a su purificación por IMAC, así como mantenimiento de la misma para experimentos posteriores. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Una vez preparada se filtra y desgasifica.

**Solución para Purificación SEC:**

Solución utilizada durante el segundo paso de purificación de VpGluR por Filtración en Gel. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0. Se preparan 200 ml los cuales se filtran y desgasifican previamente.

**Solución Amortiguadora LGDH:**

Solución amortiguadora para LGDH, utilizada en el ensayo de actividad enzimática acoplado de VpGluR. Consiste en 10 mM Tris-HCl, 50% glicerol, 0.1 mM EDTA, pH 7.5. Se prepara en fresco justo el momento de su uso.

**Solución de Actividad Enzimática:**

Solución utilizada para ensayo de actividad acoplado de VpGluR. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, 5 mM DTT, 10 mM NAD<sup>+</sup>, pH 8.0. Se utiliza agua ultra-pura (Milli-Q®) para la preparación de dicha solución.

10.2. Apéndice B – VpGrx2: Preparación de soluciones y medios

**Solución de Lisis:**

Solución utilizada en la lisis bacteriana durante la sonicación. Consiste en: 50 mM Fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0.5 mM Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 5 mM Benzamidina, 1 mM Ditioneitol (DTT), 1 mM Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 0.1 mg/ml Lisozima, pH 7.5. Esta solución se prepara al momento de su uso. El DTT se agrega en fresco justo al momento de la lisis.

**Solución de Unión (A):**

Solución utilizada durante la purificación de VpGluR por IMAC. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5. Se prepara 550 ml de solución. Una vez preparada se filtra y desgasifica para su uso en el equipo cromatográfico.

**Solución de Elución (B):**

Solución utilizada durante la purificación de VpGluR por IMAC. Consiste en: 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7.5. Se prepara 400 ml de solución. Una vez preparada se filtra y desgasifica.

**Solución Amortiguadora VpGrx2:**

Solución amortiguadora para VpGrx2, se utiliza durante la diálisis de la proteína previo a su purificación por filtración en gel, así como mantenimiento de la misma para experimentos posteriores. Consiste en: 50 mM Fosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 150 mM Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), pH 7.5. Una vez preparada se filtra y desgasifica.

**Solución para Purificación SEC:**

Solución utilizada durante el segundo paso de purificación de VpGrx2 por filtración en gel. Consiste en: 50 mM Fosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 150 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7.5. Se preparan 300 ml los cuales se filtran y desgasifican previamente.

**Solución de Actividad Enzimática tipo GRX:**

Solución utilizada para ensayo de actividad acoplado de VpGrx2. Consiste en: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.4 mM NADH, 0.5 mM GSH, 2 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA, 1 mU/ml GR, 1 mM HED, pH 8.0. Se utiliza agua ultra-pura (Milli-Q®) para la preparación de dicha solución.

**Solución de Actividad Enzimática tipo GST:**

Solución utilizada para ensayo de actividad tipo GST de VpGrx2. Consiste en: 100 mM Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 1 mM GSH, 1 mM CDNB, pH 6.5. Se utiliza agua ultra-pura (Milli-Q®) para la preparación de dicha solución.