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

ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA LIPASA LvFSH DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)

Por:

Martín Alejandro Torres Reyes

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito para obtener el grado de:

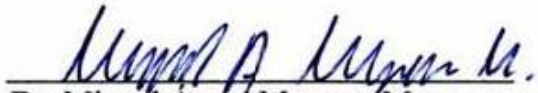
MAESTRO EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Febrero 2021

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Martín Alejandro Torres Reyes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Dra. Karina Dalila García Orozco
Directora de tesis



Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano
Integrante del comité de tesis

Dr. Hugo Javier Serrano Posada
Integrante del comité de tesis

Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Estructura Cristalográfica de la Lipasa LvFSH de Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*)" 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 Martín Alejandro Torres Reyes, 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

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de Maestría en Ciencias y el apoyo otorgado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por aceptarme dentro de su programa de posgrado.

Al proyecto de Ciencia Básica CB-2014-01-237963 “Estructura de proteínas objetivo (diana) para la búsqueda de antibacterianos contra *Vibrio parahaemolyticus* patógeno a invertebrados”.

A la Coordinación de Programas Académicos por el apoyo brindado para realizar una estancia de investigación en el Laboratorio de Agrobiotecnología en la Universidad de Colima.

A mí directora de tesis Dra. Karina Dalila García Orozco, por aceptarme como su alumno, instruirme, y apoyarme durante todo el desarrollo de este proyecto, por su paciencia y perseverancia, su confianza y su amistad, muchas gracias.

Al Dr. Hugo Serrano y a la Dra. Sara Centeno, por abrirme las puertas de su laboratorio y su grupo de trabajo, por facilitarme tanto reactivos como equipo, así como sus guianza y consejo sin los cuales este proyecto no se habría concluido.

Al Dr. Miguel Ángel Mazorra, por su gran apoyo académico, y sus palabras de aliento cuando nos cruzábamos en los pasillos.

Al Dr. Rogerio Sotelo, por aceptarme dentro de su grupo de trabajo, por sus constantes enseñanzas y consejos, y por siempre estar apoyándome en la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Estructura Biomolecular dirigido por el Dr. Rogerio Sotelo y la Dra. Karina García por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo: reactivos, equipo, libros, etc.

A todos los integrantes del Laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad de Colima, gracias por aceptarme y tratarme como un miembro más del laboratorio, por su apoyo y sus enseñanzas, y sobre todo gracias por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Cristian, Caro y Danya por su apoyo y divertidas conversaciones.

A mis amigos y compañeros del C&F crew, gracias por su amistad, apoyo, risas, y demás, sin ustedes este proceso no habría sido el mismo, los quiero a todos.

A mi padre y madre, que siempre me han dado su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, por sus palabras de aliento y consejo, muchas gracias por todo su amor, llegue hasta aquí

gracias a ustedes.

A mis hermanos, que no siempre nos llevamos bien, pero siempre estamos el uno para el otro, los quiero.

A la persona con la que estoy compartiendo esta etapa, la que no para de enseñarme cosas nuevas día a día, y me ha dado su confianza y su amor y la que amo tanto, gracias Melissa, espero que compartamos muchas cosas más de aquí en adelante.

DEDICATORIA

A mi madre, que siempre me ha apoyado y ha perseverado conmigo en cada etapa, por cada enseñanza que me has dado, y por todos tus consejos, muchas gracias mamá.

A mi padre que me ha dado su apoyo incondicional en cada decisión que he tomado, por enseñarme tantas cosas y siempre ayudarme cuando lo necesito, gracias papá.

A mis hermanos, por siempre estar ahí para mí.

A mi novia, que es la persona con la que inicié y terminé este proceso y sin la cual no habría aprendido tantas cosas en estos años, gracias por motivarme a ser siempre mejor.
Te amo!

CONTENIDO

APROBACIÓN..... 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL……..3
AGRADECIMIENTOS…….4
DEDICATORIA……6
CONTENIDO……7
LISTA DE FIGURAS..... 9
LISTA DE CUADROS.....11
RESUMEN..... 12
ABSTRACT..... 13
1. INTRODUCCIÓN..... 14
2. ANTECEDENTES..... 16
2.1 Análisis Estructural de Proteínas 16
2.1.1 Cristalización de Proteínas.....16
2.1.2 Difracción de Rayos X 19
2.1.3 Problema de Fases.....20
2.1.4 Reemplazo Molecular.....22
2.1.5 Validación de la Estructura.....23
2.2 Metabolismo de Lípidos en Invertebrados 24
2.3 Enzimas Lipasas..... 27
2.3.1 Características Generales.....27
2.3.2 Estructura y Mecanismo de Catálisis de las Lipasas.....28
2.4 Hidrolasa de la Familia Serina de *Litopenaeus vannamei* (LvFSH)..... 30
3. HIPÓTESIS 33
4. OBJETIVOS..... 34
4.1 Objetivo General..... 34
4.2 Objetivos Específicos..... 34
5. MATERIALES Y MÉTODOS..... 35
5.1 Obtención y Purificación de LvFSH 35
5.2. Ensayo de Actividad Enzimática 36
5.3 Cristalización de LvFSH 36
5.4 Optimización de la Cristalización..... 37
5.5 Análisis de Datos de Difracción de Rayos X..... 37
5.5.1 *iMosflm*.....38
5.5.2 *Pointless*.....39
5.5.3 *Scala* 39
5.5.4 *Matthews_Coef*.....39

CONTENIDO (continuación)

5.6 Generación y Afinamiento del Modelo Estructural de LvFSH 39
5.6.1 *Phaser* 40
5.6.2 *Phenix.refine* 40
5.7 Análisis de Cargas Superficiales 41
5.8 Acoplamiento Molecular (*Docking*) 41
5.9 Comparación Estructural 42

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 43
6.1 Expresión y Purificación de LvFSH 43
6.2 Ensayo de Actividad Enzimática 44
6.3 Cristalización de LvFSH 45
6.4 Optimización de la Cristalización 46
6.5 Análisis de Datos Cristalográficos 47
6.6 Gemelitud (*twinning*) 48
6.7 Resolución de Fases y Afinamiento del Modelo de LvFSH 52
6.8 Estructura de LvFSH 53
6.8.1 Agujero Oxianión 54
6.8.2 Dominio Tapadera (*Lid*) 55
6.8.3 Análisis de Cargas Superficiales 57
6.8.4 Acoplamiento Molecular (*Docking*) 59
6.8.5 Comparación Estructural 61

7. CONCLUSIÓN 65

8. RECOMENDACIONES 66

8.BIBLIOGRAFÍA 67

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso general de formación de un cristal…….....	17
2	Esquematización de las fases de la cristalización en función de la concentración de proteínas y de un precipitante.....……	17
3	Técnicas de cristalización……..	18
4	Diagrama representativo de la Ley de Bragg……..…….	19
5	Esquema del problema de las fases…..…….	20
6	Planos cristalinos de un cristal cúbico…….....	21
7	Diagrama de Ramachandran……..	24
8	Las dos principales rutas metabólicas para la síntesis de TAGs…….....	25
9	Cambios en las GLs de *L. vannamei* en respuesta al ayuno ……..	27
10	Algunas reacciones catalizadas por lipasas…….....	28
11	Plegado característico de las α/β hidrolasas…….....	29
12	Mecanismo general de reacción de las lipasas……	29
13	Modelo estructural de LvFSH…….....	31
14	Ejemplo de cristal montado en lazo (*loop*) previo a un experimento de difracción con rayos X…….....	38
15	Sobreexpresión de LvFSH recombinante……...	43
16	Purificación de LvFSH……...	44
17	Cristales de LvFSH obtenidos utilizando la condición 54 del kit Index……	46
18	Optimización de cristalización de la proteína LvFSH a partir de la condición 54 Index a 25 °C…….....	46
19	Optimización de cristalización de la proteína LvFSH a partir de la condición 54 Index a 15 °C…….....	47
20	Ejemplo de un cristal que presenta gemelitud macroscópica…….	49
21	Esquema de gemelitud hemihedral de un cristal…….....	50
22	Resultados del análisis *phenix.xtriage*, en PHENIX de los datos experimentales……..	51

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
23	Estructura tridimensional de la proteína LvFSH……..	53
24	Codo nucleofílico y tríada catalítica de LvFSH……..	54
25	Agujero Oxianión de LvFSH……..	55
26	Estructura tapadera de LvFSH…….....	56
27	Mapas de potencial electrostáticos presentados en la superficie la estructura de LvFSH……..	58
28	Acoplamiento LvFSH contra 4 sustratos *p*-nitrofenil ésteres……..	60
29	Superposición estructural de LvFSH de *L. vannamei*……..	61
30	Superposición estructural de los dominios tapadera…….	62
31	Superposición estructural de la tríada catalítica y el agujero oxianión……	63

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Actividad de LvFSH contra dos sustratos……..…….....	45
2	Parámetros estadísticos…….....……..	48
3	Parámetros estadísticos de la resolución de fases teóricas…….....….	52
4	Valores estadísticos de los modelos resultantes del acoplamiento con cada sustrato…….....	59

RESUMEN

La estructura de una proteína permite profundizar en su función así como, comportamiento, y posibles interacciones con otras moléculas. Por tanto, los estudios estructurales son una herramienta fundamental en el estudio de las proteínas. Hasta el momento el conocimiento de las proteínas con actividad lipolítica es escaso, especialmente en especies como el camarón, habiendo reportadas a la fecha tres enzimas lipasas de este organismo, pero ninguna estructura depositada en el *Protein Data Bank* (PDB). El objetivo de este estudio es determinar la estructura tridimensional de una proteína con actividad tipo lipasa de *Litopenaeus vannamei* (LvFSH) e identificar sus principales características estructurales con el fin de proponer su posible función y mecanismo de acción. Se sobreexpresó la proteína recombinante en una cepa de *E. coli* BL21-SI mediante inducción con IPTG y NaCl. Posteriormente, LvFSH se purificó en dos pasos cromatográficos (afinidad a metales inmovilizados-IMAC e interacción hidrofóbica-HIC). Mediante pruebas de actividad enzimática contra dos sustratos sintéticos, p-nitrofenil laurato (*p*-NPL, C12) y p-nitrofenil palmitato (*p*-NPP, C16), la enzima mostró mayor actividad hacia el *p*-NPL. La cristalización se realizó bajo condiciones obtenidas de estudios preliminares con la condición 54 del kit Index®. De modo paralelo se analizaron datos cristalográficos provenientes de experimentos previos de cristalización y difracción de la proteína de estudio. Finalmente se obtuvo una estructura con valores de R_{work} y R_{free} de 0.3140 y 0.4024, respectivamente. Se observó el plegamiento α/β hidrolasa, el cual consta de 4 hebras-β, rodeadas por 5 hélices-α. Se identificó el sitio catalítico de la enzima observándose la tríada catalítica (Ser111, Asp169, His196), así como el agujero oxianión el cual está compuesto por los aminoácidos Phe18 y Gln112, y el dominio tapadera compuesto por un lazo que va de Glu50 a Gly63. Los estudios de la superficie electrostática de la enzima muestran un comportamiento que concuerda con el de las lipasas, aumentando las cargas negativas en el sitio activo a pH básico. Los ensayos de acoplamiento muestran que los sustratos de cadena larga (C12, C16) tienen un acomodo más ordenado dentro del sitio activo, mientras que los de cadena corta (C2, C4) pueden introducirse de formas inespecíficas. La comparación estructural, mostró que LvFSH tiene similitudes con las lisofosfolipasas. Los resultados sugieren que la LvFSH está involucrada en la hidrólisis de lípidos intracelulares.

Palabras clave: α/β hidrolasa, cristalografía de rayos X, lipasa, lisofosfolipasa, LvFSH.

ABSTRACT

The knowledge and availability of protein structures helps us deepen the understanding of their metabolic behavior and possible interactions with other proteins or ligands. Thus, protein structure determination is a fundamental tool in protein research. Currently, studies on proteins with lipase activity in shrimp is scarce, particularly in *Litopenaeus vannamei*. Until now three lipases have been characterized from this organism, however there are no structures of a lipase available on PDB. The main objective of this study was to determine the 3D structure of LvFSH, a protein with lipase activity from *L. vannamei* and identify its main structural characteristics that may allow us to propose its metabolic function. The protein was expressed in E coli BL21-SI by induction with IPTG and NaCl. After lysis the supernatant was recovered and used to purify LvFSH in two chromatographic steps (Ni^{2+} affinity-IMAC and Hydrophobic Interaction-HIC). Enzymatic activity for soluble recombinant LvFSH was tested against two synthetic substrates (*p*-NPL and *p*-NPP) showing higher activity against *p*-NPL. Crystallization of the protein was accomplished using the microbatch method, with condition 54 from the Index® crystallization kit. In parallel, crystallographic data already available from a previous experiment of the same protein was analyzed. Final structure reached R values of 0.3140 and 0.4024 for R_{work} and R_{free} respectively. The α/β hydrolase fold was observed, consisting in a core of 4 β-sheets surrounded by 5 α-helixes and the conserved catalytic triad was identified (Ser111, Asp169, His196), as well as the oxyanion hole, comprised by Phe18 and Gln112, and the lid domain, which is formed by a loop (Glu 50 – Gly63). Electrostatic potential analyses in the surface of LvFSH showed similar results to other lipases, increasing its negative charges in the active site at alkaline pH. Docking assays showed an ordered arrangement of long chain substrates (C12, C16) in the active site, whereas short chain (C2, C4) show a more disordered interaction. Structural comparison showed similarities with lysophospholipases. Results suggest that LvFSH is involved in the hydrolysis of intracellular lipid.

Keywords: α/β hydrolase, X-ray crystallography, lipase, lysophospholipase, LvFSH.

1. INTRODUCCIÓN

Las lipasas son enzimas hidrolíticas que se encargan de degradar y metabolizar lípidos, y juegan un papel muy importante dentro del metabolismo de los seres vivos. Todas las lipasas conocidas hasta ahora presentan el mismo tipo de plegamiento, conocido como α/β hidrolasa y un mismo mecanismo catalítico. Esta estructura es compartida con algunas enzimas como esterasas, proteasas, deshalogenasas, epóxido hidrolasas y peroxidasas, que en conjunto conforman la familia de las α/β hidrolasas (Anobom *et al*., 2014). La estructura canónica de este plegamiento consiste en ocho hebras-β intercaladas por hélices-α, además poseen una triada catalítica característica Ser, Asp, His; y una secuencia conservada GXSXG (Sun *et al*., 2014).

Al ser enzimas con una alta estabilidad en distintas condiciones, son en aplicaciones industriales. Han sido ampliamente utilizadas en la producción de fármacos, en estudios médicos, en la producción de biodiesel, papel, textiles y detergentes, entre otros (Sarmah *et al*., 2017; Guerrand, 2017).

Existe poca información sobre la caracterización de enzimas con actividad lipolítica en *Litopenaeus vannamei*, hasta el momento existen reportes de caracterización bioquímica de dos lipasas de camarón blanco: una intracelular extraída de pleópodos, donde se le hizo una caracterización bioquímica y se obtuvieron sus parámetros óptimos de actividad enzimática (Rivera-Pérez, 2011). Se estudió también una lipasa extracelular digestiva, donde además de los parámetros enzimáticos óptimos y la caracterización bioquímica de la proteína, se identificó el pentapéptido conservado y la tríada catalítica característica en la secuencia de aminoácidos (Rivera-Pérez, 2011b). En un estudio más reciente se realizó una caracterización más detallada de una hidrolasa intracelular con actividad lipolítica (LvFSH), donde se describieron aspectos generales de la enzima mediante herramientas bioinformáticas y bioquímicas, y se hizo un primer acercamiento a la función que esta cumple dentro del organismo (García-Orozco *et al*., 2019).

Sin embargo ninguna estructura tridimensional de lipasas de *L. vannamei* está disponible en bases de datos. La estructura de una enzima permite profundizar en el estudio del mecanismo de acción, brinda información esencial de su función, comportamiento y las posibles interacciones que pudiera tener con otras moléculas, de ahí la importancia de los estudios estructurales en cualquier tipo de proteína aún no reportada.

En este trabajo se buscó obtener una estructura tridimensional de una lipasa intracelular recombinante (LvFSH) del camarón blanco mediante técnicas cristalográficas a partir de un juego de datos existente, a fin de profundizar en la relación estructura-función e importancia de esta enzima dentro del organismo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Análisis Estructural de Proteínas

El método más utilizado para la determinación de estructuras de proteínas es la difracción de rayos X, aunque también existen otros métodos que emplean la dispersión de partículas como neutrones y electrones, pero estos últimos solo representan una pequeña parte de los trabajos reportados (<0.1%) (Wlodawer *et al.*, 2013). Estos métodos requieren de una muestra de proteína cristalizada, la cual será irradiada con rayos X, y posteriormente analizada por métodos computacionales para determinar la estructura tridimensional.

2.1.1 Cristalización de Proteínas

La cristalización de proteínas se descubrió hace aproximadamente 170 años, siendo la hemoglobina de gusano y pescado los primeros cristales de proteína obtenidos. Sin embargo su uso práctico se dio 1880 cuando la cristalización se usó para purificar proteínas de semillas. Durante este periodo los cristales de proteína solo serían usados para motivos de purificación y demostración de pureza (McPherson, 1999). No es sino hasta finales de los años 1930 del siglo pasado, que los cristales proteicos comienzan a tener más relevancia, gracias a la aplicación de rayos X a dichos cristales con el fin de obtener información estructural, lo que provocó un aumento de la demanda de cristales de proteínas en los años 1960 y 1970, a la vez que se consolida la cristalografía de proteínas (McPherson, 2014).

El proceso de cristalización consta de tres etapas: nucleación, crecimiento, y cese de crecimiento (Fig. 1) Durante la nucleación, las moléculas deben asociarse en agregados tridimensionales termodinámicamente estables, a esto se le llama núcleo crítico, que funcionará como templado para la formación del cristal. El crecimiento del cristal ocurre cuando las partículas difunden hacia la superficie del núcleo crítico y se ensamblan de manera ordenada sobre este (Rupp, 2010).

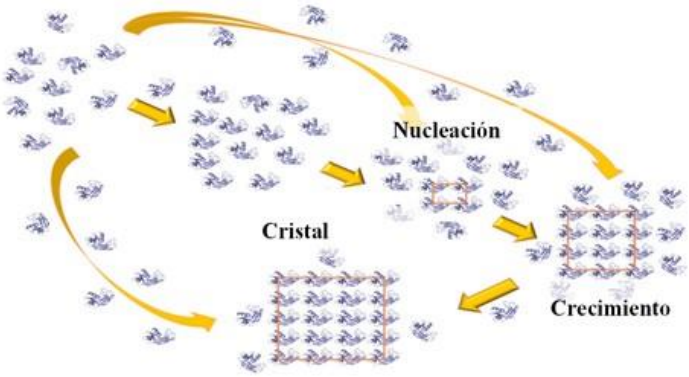


Figura 1. Proceso general de la formación de un cristal (Krauss *et al*., 2013).

Para que el proceso de cristalización se lleve a cabo, la solución debe estar en un estado de supersaturación, es decir, la concentración de la proteína debe superar el límite de solubilidad. El nivel de supersaturación determina el fenómeno que ocurrirá dentro de la solución (Fig. 2), si el nivel es muy alto ("precipitación") se forman agregados amorfos de proteínas sin formar cristales; en el nivel intermedio ("nucleación") es donde se forma el núcleo crítico, que funciona como andamio para la formación del cristal, y se da un poco de crecimiento; y en el nivel bajo ("metaestable") se promueve el crecimiento acelerado del cristal (Krauss *et al.*, 2013).

Figura 2. Esquematización de las fases de la cristalización en función de la concentración de proteínas y de un precipitante. En la zona insaturada la proteína está en su estado soluble, en la zona de precipitación la proteína se precipita sin la formación de cristales. Debajo de la zona de precipitación se da la nucleación pero el crecimiento de los cristales es lento, mientras que en la zona metaestable no permite la nucleación pero es ideal para el crecimiento del cristal (Koruza *et al.*, 2018).

Existen varios métodos que se pueden utilizar para cristalizar proteínas, pero en este trabajo solo se describen dos: *microbatch* y difusión de vapor (figura 3a, b).

La cristalización por *microbatch* consiste en colocar en una placa de pozos cóncavos, una gota de la solución de proteína concentrada y una gota de solución de precipitante, y finalmente se cubren con aceite de parafina para evitar la evaporación (Fig. 3). Este proceso inicia con una concentración alta de proteína que promueve la nucleación en la solución, conforme aumenta el número de núcleos y baja la concentración de proteína se inicia el crecimiento y formación de los cristales (Chayen, 1992).

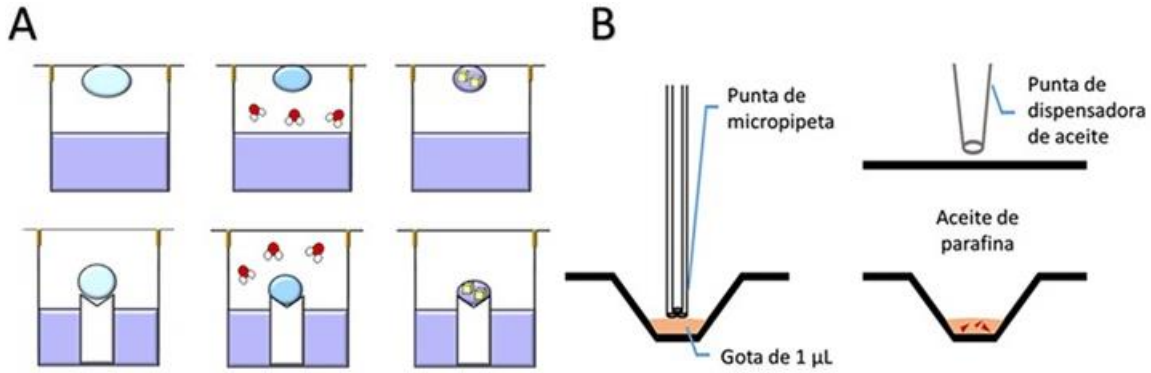


Figura 3. Técnicas de cristalización. (A) Cristalización por difusión de vapor. (B) Cristalización por *microbatch*. (Krauss *et al*., 2013).

En la difusión por vapor existen dos formatos: el de gota colgante y gota sentada. En este procedimiento una gota de la solución de proteína se mezcla con una gota de solución precipitante, y esta misma solución de precipitación es depositada también en un reservorio donde la concentración de la solución precipitante es mayor que en la gota, el agua en la gota se evapora por difusión hasta que se alcanza el equilibrio de concentraciones. En este proceso, mientras se aumentan las concentraciones de proteína en la gota, inicia la formación de los cristales (Chayen y Saridakis, 2008).

2.1.2 Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X está basada en la interacción que tiene la muestra cristalina con los rayos X monocromáticos que inciden en él. (Bunaciu *et al.*, 2015). Esta interacción es descrita por la ley de Bragg (figura 4) descrita en la siguiente ecuación:

$$n\lambda = 2dsin\theta \qquad (1)$$

Donde *n* es el orden de reflexión que puede ser denotado como el número de rayos que atraviesan los diferentes planos de la matriz cristalina, λ es la longitud de onda de los rayos X, *d* es el espacio que hay entre los planos del cristal que genera la difracción, y θ es el ángulo de difracción (Waseda *et al.*, 2011).

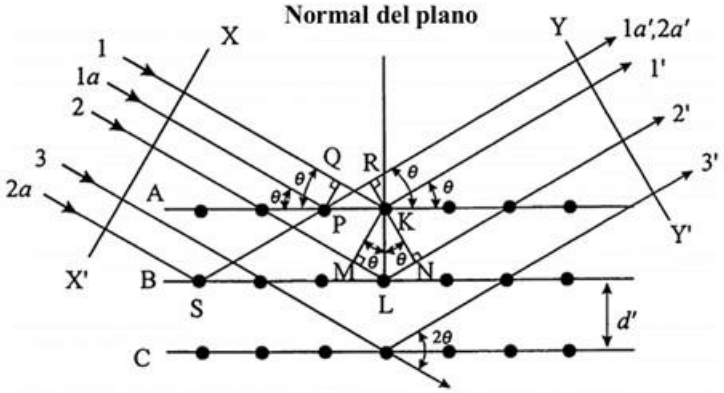


Figura 4. Diagrama representativo de la Ley de Bragg (Waseda *et al.*, 2011).

Los primero rayos X eran generados por un tubo de rayos catódicos y en tiempos más recientes se utilizan fuentes de mayor intensidad como la radiación de sincrotrón, que utilizan partículas cargadas aceleradas a altas velocidades generando los rayos X, que son filtrados, concentrados y dirigidos hacia la muestra (Papiz, y Winter, 2017).

Como consecuencia de la Ley de Bragg, las longitudes de onda utilizadas para este análisis deben ser similares a la de las distancias que existen entre los átomos de la molécula (normalmente 0.15 nm = 1.5 Å), a mayor similitud mejor será la calidad de los datos obtenidos (Ilari y Savino, 2017). Al ser difractados los rayos por el cristal, estos son captados por un detector que los convierte en imágenes computacionales llamadas difractogramas que cuantifican las intensidades de las reflexiones, para posteriormente ser analizadas por paquetes informáticos para generar un modelo estructural cristalográfico experimental, al resolver el problema de fases (Wlodawer *et al.*, 2008).

2.1.3 Problema de Fases

Cuando se aplican rayos X a un cristal, este difracta los rayos en distintas direcciones dependiendo del arreglo de la celda unitaria, posición del cristal y concentración de electrones (Cowtan, 2003). Estos rayos difractados pueden interferir unos con otros y dependiendo del tipo de la interacción estos pueden potenciar la señal (constructiva) o debilitarla (destructiva) (figura 5).

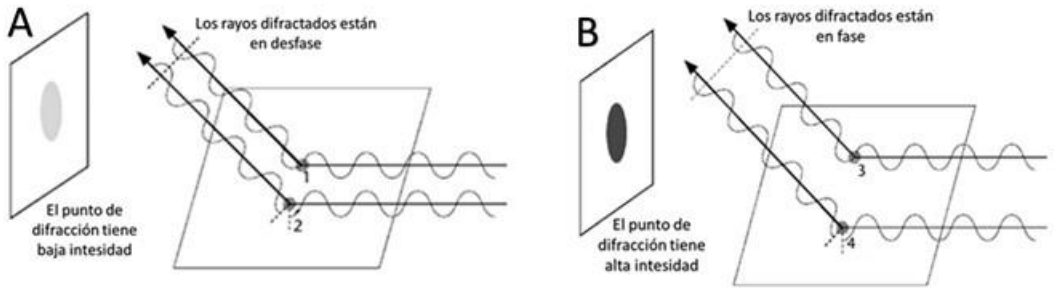


Figura 5. Esquema del problema de las fases. (A) Interferencia destructiva o rayos en "desfase". (B) Interferencia constructiva o rayos en "fase" (Cowtan, 2003).

Un cristal ideal posee un arreglo periódico de moléculas idénticas en forma de red, y por tanto cada densidad electrónica estará repetida en intervalos. La unidad básica de dichas repeticiones es lo que se conoce como **celda unitaria**. Los rayos difractados que reflejen la red cristalina darán una

señal fuerte, mientras que los que se difracten en otras direcciones darán una señal débil (Cowtan, 2003).

En el experimento de difracción se miden las intensidades de onda generadas por los rayos difractados por los planos del cristal (*hkl*) (figura 6). El valor de la intensidad es una medida del número de electrones presentes en un plano. La amplitud de la onda $|F_{hkl}|$ es proporcional a la raíz cuadrada de la intensidad. Y para calcular la densidad electrónica en una posición dada (*xyz*) de la celda unitaria se aplica una sumatoria a todos los planos *hkl*.

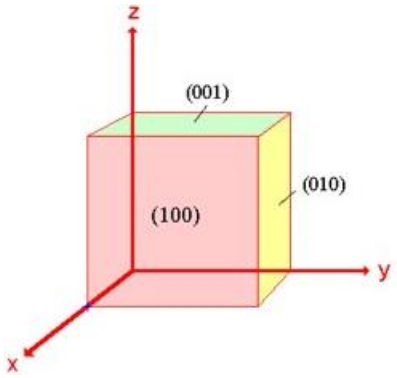


Figura 6. Planos cristalinos de un cristal cúbico, estos se denotan como índices de Miller (*hkl*) y se escriben entre paréntesis.

Esto quiere decir, que la densidad electrónica en un punto (*xyz*) es la suma de los efectos que tienen sobre ese punto los rayos difractados por un plano *hkl*, donde la amplitud de los rayos depende del número de electrones presentes en ese plano y tomando en cuenta la relación con las fases presentes (Taylor, 2010). Esto es matemáticamente descrito por la fórmula:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V}\sum |F_{hkl}| \exp(i\alpha_{hkl}) \exp[-2\pi i(hx - ky - lz)] \quad (2)$$

Es posible obtener las amplitudes experimentalmente, pero no las fases. En esto consiste el problema de las fases.

Dado que no existe relación entre la amplitud y las fases, este problema sólo puede ser resuelto haciendo uso de las fases de la estructura de otra molécula. Si se pudiera asumir información de la fases, podríamos resolver el problema de las fases, principio en el que se basan el método más común para resolver este problema, el reemplazo molecular (Taylor, 2003).

2.1.4 Reemplazo Molecular

Existen varios métodos para resolver el problema de fases, pero el más utilizado en macromoléculas es el reemplazo molecular (RM) (Rossman y Blow, 1962), donde a partir de una estructura reportada de una proteína similar a la proteína de interés, es posible hacer un cálculo inicial de las fases de esta molécula (Papiz y Winter, 2017).

El RM es el procedimiento más fácil y rápido computacionalmente para la resolución de la estructura de una proteína. Sin embargo, está sujeta a la disponibilidad de estructuras que sean lo suficientemente parecidas a la molécula de estudio. Para que la efectividad del método sea alta se requiere que la estructura de comparación presente al menos el 30% de identidad (similitud de la secuencia de aminoácidos) con la proteína de interés. Aunque por debajo de estos estándares y con una identidad del 20% se conserva en gran parte el plegamiento de la proteína, el plegado general podrá presentar demasiadas diferencias para ser evaluada con este método (Abergel, 2013).

Ya que la densidad electrónica es la transformada de Fourier del patrón de difracción, es posible tomar una estructura ya depositada y colocarla dentro del mapa de la celda unitaria, y aplicarle otra transformada de Fourier para calcular las intensidades y fases que se generarían, y después aplicarlas a la estructura que se está analizando. Esto se logra al probar diferentes rotaciones y traslaciones del modelo dentro de la celda unitaria, para encontrar la mayor homología posible (Haydn, 2016). Dentro de este programa se realizan automáticamente los cálculos de rotación y traslación para obtener el mapa de densidades electrónicas (Papiz y Winter 2017). Los parámetros que se deben tener en cuenta para saber si se ha conseguido realizar el reemplazo molecular de forma correcta son los estadísticos LLG y TFZ. LLG (Log Likelihood Gain) es un estadístico que nos indica la probabilidad de que las mediciones se hayan hecho en el modelo generado, lo que nos da una idea de la concordancia del modelo con los datos experimentales. TFZ (Translational

Function Z-score) es el número de desviaciones estándar sobre la media para LLG sobre la función de traslación. Si se obtuvo una solución óptima el valor de LLG debe ser mayor a 0 y TFZ debe ser mayor a 5.

2.1.5 Validación de la Estructura

Para tener certeza que los resultados de nuestro experimento son confiables es necesario que las estructuras generadas pasen por un proceso de validación, donde sean comprobadas sus características esteroquímicas.

La validación de las estructuras permite observar dos fenómenos. Primero, la cuantificación del nivel de concordancia entre el modelo que obtuvimos y los datos experimentales. Y segundo, al comparar la geometría general de la proteína contra estructuras reportadas en el *Protein Data Bank* (PDB, por sus siglas en inglés) se puede observar si conservan las características y dominios estructurales de proteínas similares (Laskowski *et al.*, 1998).

Usualmente, las características esteroquímicas de la estructura secundaria de la proteína nos permiten comprobar su validez, más específicamente los valores de sus ángulos φ y ψ del enlace peptídico (Carrazcosa, 2014). Esto se comprueba al comparar los ángulos obtenidos con el diagrama de Ramachandran (figura 7), este diagrama muestra las orientaciones preferenciales de los ángulos φ y ψ en estructuras proteicas de buena resolución. Se divide en tres tipos de área: la más favorecida, permitida, y no permitida. Un buen modelo no sólo deberá tener pocos residuos en las zonas no permitidas, sino también muchos en las zonas favorecidas (Kleywegt y Jones, 1996).

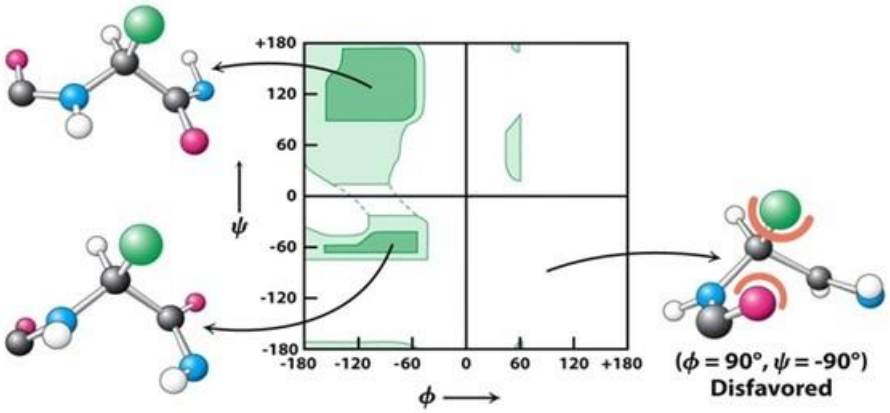


Figura 7. Diagrama de Ramachandran. Se pueden observar la relación de los ángulos φ y ψ correspondientes a hélices α (zona intermedia izq.) y lazos (zona intermedia derecha hebras-β (esquina superior izq.). Teóricamente, los valores de φ y ψ para estas estructuras secundarias deben estar aglomerados en -57, -47 y -80, +150, respectivamente. Las zonas verdes representan las zonas favorecidas y permitidas, mientras que las zonas blancas representan las desfavorecidas (Berg *et al*., 2013).

2.2 Metabolismo de Lípidos en Invertebrados

Los lípidos son una gran fuente de energía, suministrando más calorías que los azúcares, además funcionan como bloques para la formación de membranas y moléculas de señalización intracelular (Bailey y Dunbar, 1993).

Cuando se presenta una nutrición adecuada, los lípidos ingeridos son llevados a la síntesis de triacilglicerol (TAG) para su almacenamiento, esto puede suceder por dos vías metabólicas (figura 8). 1) En la primera vía el glicerol-3-fosfato (G-3-P) es utilizado como sustrato, el cual es convertido en lisofosfatidato (LPA) y posteriormente en fosfatidato por la enzima 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT). El fosfatidato es a continuación desfosforado a diacilglicerol (DAG) por la enzima fosfatidato desfosfatasa. 2) La segunda ruta metabólica implica la producción de DAGs utilizando monoacilgliceroles (MAGs) por acción de la enzima monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT). En ambas rutas el resultado final es DAG el cual es finalmente convertido en TAG por adición de otro ácido graso por acción de la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (Yen *et al*., 2015). Posteriormente los TAGs generados son almacenados dentro de la célula en organelos llamados gotas lípidicas (GLs).

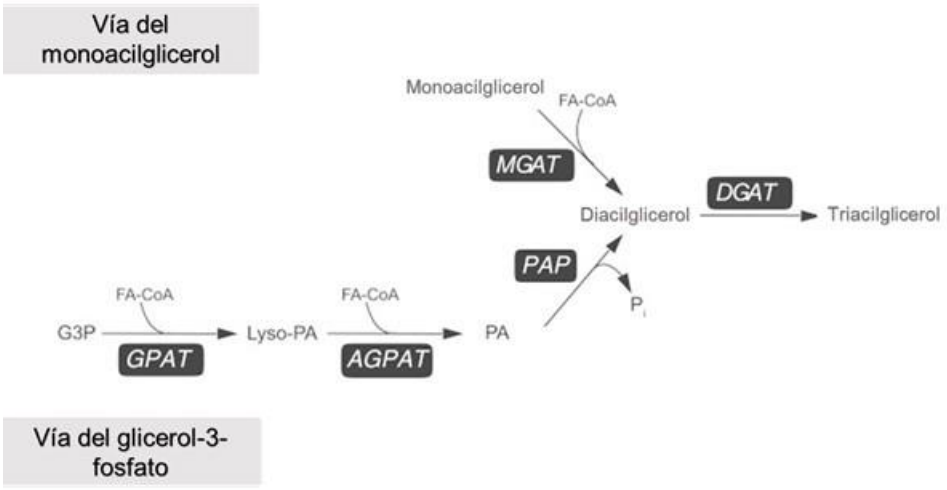


Figura 8. Las dos principales rutas metabólicas para la síntesis de TAGs (Yen *et al*., 2015).

En estadios de falta de nutrientes como el ayuno, se puede hacer uso de los lípidos almacenados para mantener los niveles energéticos de la célula. Esto sucede mediante la hidrólisis de los TAGs almacenados en las GLs por acción de lipasas intracelulares, lo cual libera un ácido graso que es utilizado para obtener energía (Ahmadian *et al.*, 2007). Este proceso sucede de forma escalonada, y ha sido descrito en los vertebrados. Primero los TAGs almacenados son hidrolizados por la acción de la enzima ATGL para generar un ácido graso libre (AGL) y DAG, posteriormente la enzima Lipasa Sensible a Hormonas (HSL, por sus siglas en inglés) hidroliza el DAG para liberar otro AGL y MAG, y finalmente el MAG es hidrolizado por la enzima Monoacilglicerol lipasa (MGL, por sus siglas en inglés) para generar un AGL y glicerol (Meyers *et al.*, 2017). Los lípidos hidrolizados pueden ser dirigidos a diversas funciones, como la β-oxidación en la mitocondria para la obtención de energía, la síntesis de membranas o moléculas de señalización (Digel *et al*., 2010). Como se mencionó con anterioridad, el proceso de digestión, almacenamiento y uso de reservas de lípidos está mediado por enzimas lipasas. Estas han sido estudiadas de manera amplia en vertebrados demostrando sus actividades, funciones, rutas metabólicas y potenciales usos biotecnólogicos. La información de estas enzimas en invertebrados es escasa, existiendo solo estudios de caracterización bioquímica principalmente de insectos (Arrese *et al*., 2006; López-Mañanes *et al*., 2015; Santana *et al*., 2017; Ranjbar *et al*., 2014) y en menor grado en invertebrados marinos (Slim *et al*., 2007; Forrellat *et al*., 2002; del Monte *et al*., 2002).

Rivera-Pérez (2015) realizó una búsqueda y comparación de genes de lipasas en 5 especies de invertebrados marinos (*Crassotrea gigas*; *Lottia gigantea*; *Strongylocentrotus purpulatis*;

Nematostella vectensis; *Amphimedon queenslandica*) y un invertebrado de agua dulce (*Daphnia pulex*). Se encontró que el genoma de estas especies contiene lipasas pertenecientes a diversas familias con un alto grado de ortología con lipasas de vertebrados, y estos organismos poseen en general el mismo número de genes correspondientes a lipasas que el genoma humano. En todos los genomas se encontró al menos un gen que correspondía a las enzimas HSL y AGTL, enzimas relacionadas con el metabolismo de lípidos intracelulares como se mencionó con anterioridad.

En *Litopenaeus vannamei* se han aislado y caracterizado tres lipasas, una digestiva y dos intracelulares (Rivera-Pérez *et al*., 2011; Rivera-Pérez *et al*., 2011b; García-Orozco *et al*., 2019) y los estudios en cuánto al metabolismo de lípidos son escasos. En *L. vannamei* se han realizado estudios que demuestran la existencia del mecanismo de utilización de reservas lipídicas en dichas situaciones. Rivera-Pérez y García-Carreño (2011) estudiaron la expresión de una lipasa digestiva (*pvl*) y una lipasa intracelular (*pv_il*) en condiciones de ayuno, encontrando que existía un mecanismo opuesto en la expresión de estas proteínas; cuando se cuenta con una alimentación adecuada se expresa mayoritariamente *pvl* y en menor concentración *pv_il*, mientras que cuando se presenta un ayuno prologado se reduce la expresión de *pvl* y aumenta la expresión de *pv_il*, lo cual indica que se utilizan los TAGs almacenados para compensar la falta de alimento. Además, Cervillione *et al*. en 2017, mediante análisis computacionales midieron los cambios en el diámetro de las GLs en secciones congeladas de grupos de camarones que se sometieron a tres tratamientos (uno por grupo) por 15 días: FE (alimentados con normalidad), ST (ayuno), REF (ayuno por 5 días y realimentación por 10 días). Se encontró que en los camarones del grupo FE no hubo cambios significativos en el área de las GLs, mientras que el grupo ST hubo una disminución considerable llegando al 0% en los primeros 5 días y manteniéndose así durante el resto del ensayo (figura 9a). Finalmente el grupo REF se observó una disminución hasta el 0% dentro de los primeros 5 días y al comenzar la realimentación esta volvió a niveles normales. Se observó también de manera visual la presencia de las GLs en los diferentes grupos de estudio al finalizar el ensayo, donde es posible observar la disminución de las GLs en el grupo ST (figura 9b).

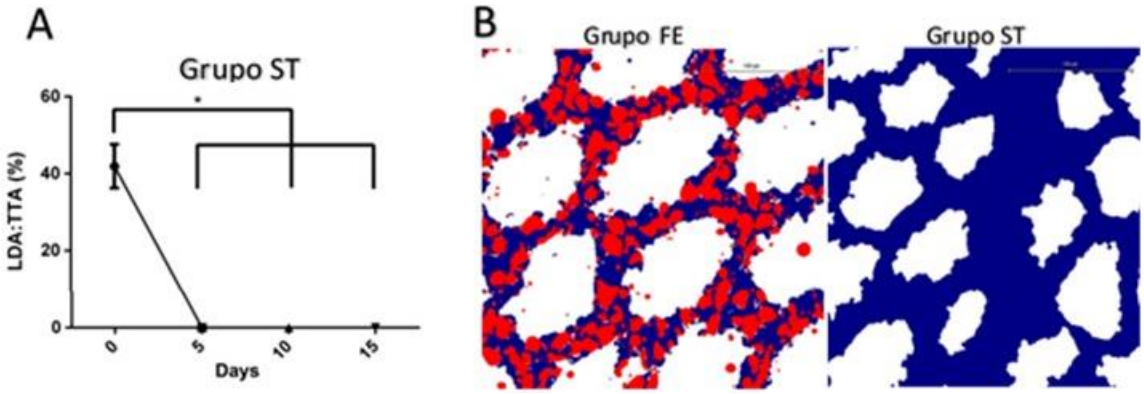


Figura 9. Cambios en las GLs de *L. vannamei* en respuesta al ayuno. (A) Cambios en el área de las gotas lipídicas (LDA) expresada como porcentaje del área total del tejido (TTA) en el grupo ST (ayuno). (B) Comparación visual de la presencia de GLs (manchas rojas) entre los grupos FE y ST después de los 15 días del ensayo (Cervillione *et al*., 2017).

El uso de lípidos intracelulares mediado por lipasas, es un mecanismo de regulación que el camarón utiliza para obtener energía o sintetizar moléculas de importancia metabólica en condiciones de falta de alimento o estrés. Estas condiciones pueden presentarse en situación de cultivo en forma de ayuno, hipoxia, cambios en la temperatura o pH, estrés osmótico o por los ciclos de muda y reproducción (Chen *et al*., 2015; Galindo *et al*., 2009), lo que resalta la importancia del conocimiento a mayor profundidad del metabolismo intracelular de lípidos y de las lipasas intracelulares que lo llevan a cabo.

2.3 Enzimas Lipasas

2.3.1 Características Generales

Las lipasas son enzimas hidrolasas (E.C. 3.1.1.3) que actúan sobre los enlaces éster de moléculas lipídicas y catalizan la degradación de triacilgliceroles a glicerol y ácidos grasos libres al romper los enlaces éster carboxílicos (Dias *et al.*, 2011). Aunque también pueden catalizar otras reacciones (Casas-Godoy *et al*., 2018), como interesterificación, esterificación, acidólisis, alcohólisis y aminólisis (figura 10).

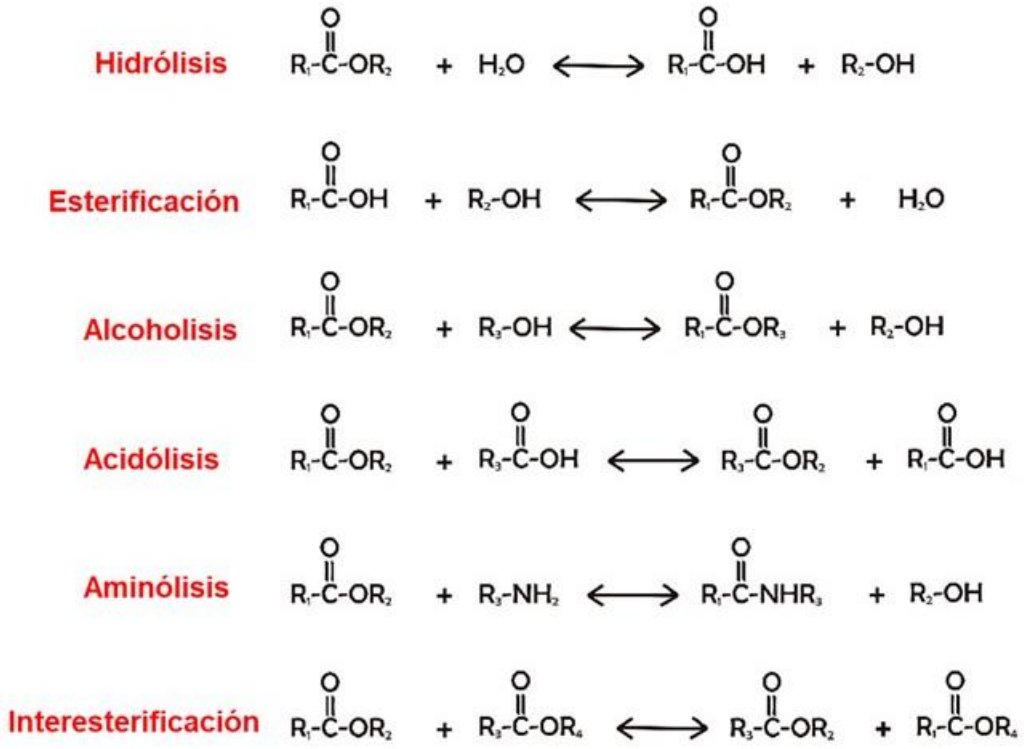


Figura 10. Algunas reacciones catalizadas por lipasas (Borrellli y Trono, 2015).

Estas enzimas tienen mayor actividad cuando están en presencia de sustratos insolubles como los triglicéridos de cadena larga (> C10), diferente a las esterasas que actúan sobre sustratos solubles como los ésteres sencillos (< C6) (Dias *et al.*, 2011).

2.3.2 Estructura y Mecanismo de Catálisis de las Lipasas

Las lipasas pertenecen a la clase de las α/β hidrolasas, donde también se encuentran enzimas esterasas, acetilcolinasas, cutinasas, carboxilesterasas, y epóxido hidrolasas (Wildmann *et al.*, 2010). Las enzimas de esta familia presentan un plegado característico mostrado en la figura 11, que consiste en 8-11 hebras-β mayormente paralelas que son flanqueadas por hélices α. Pueden tener motivos accesorios que confieran propiedades de regulación o selectividad (Marchot y Chatonnet, 2012).

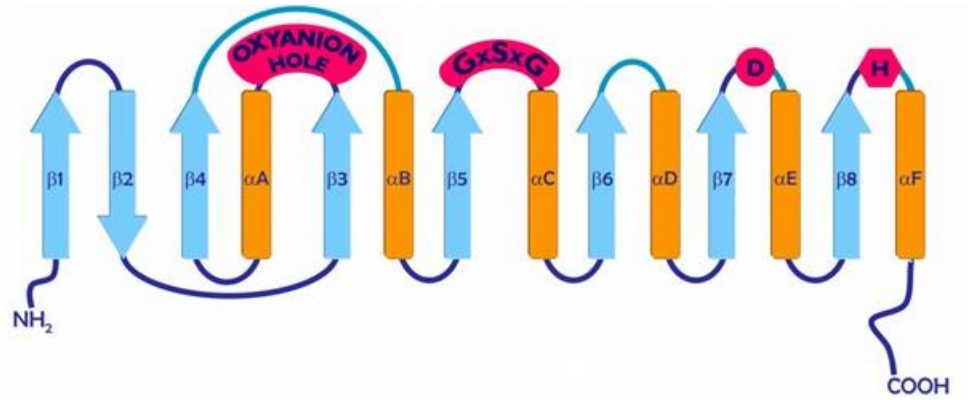


Figura 11. Plegado característico de las α/β hidrolasas. Se distinguen el codo nucleofílico (GXSXG), el residuo acídico (D) y el residuo de histidina (H) (Borrelli y Trono, 2015).

El sitio activo es una tríada catalítica altamente conservada que consiste en un residuo nucleofílico, un residuo acídico catalítico y una histidina que actúa como base catalítica. Dentro de las lipasas el residuo nucleofílico es siempre una serina y está ubicado dentro de una secuencia conservada (GXSXG) conocida como "codo nucleofílico", mientras que el residuo ácido (Asp) se localiza después de las hebras-β6 o β7 y está unido por puentes de hidrógeno al residuo de histidina que se encuentra en un lazo después de la lámina β8 (Borrelli y Trono, 2015).

La reacción de catálisis se ilustra en la figura 12, se inicia con un ataque nucleofílico por parte de la serina del sitio activo sobre el carbono que está en el enlace éster, se forma un complejo acil-enzima y un alcohol es liberado. Posteriormente, el complejo es hidrolizado y liberado, regenerando la enzima (Dias *et al.*, 2011).

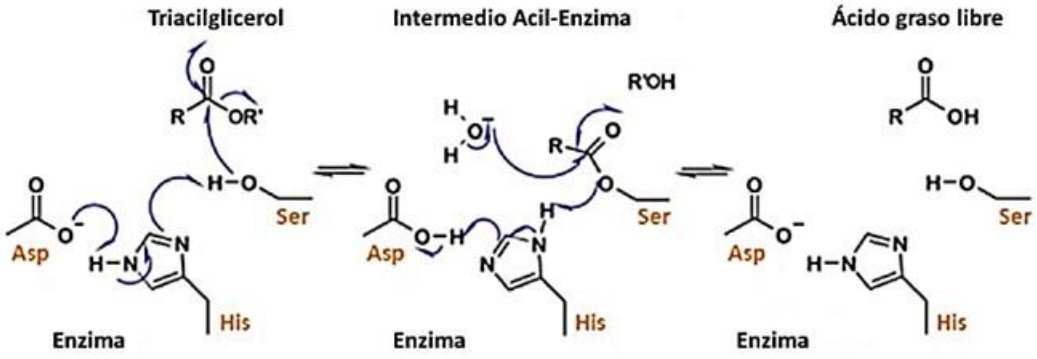


Figura 12. Mecanismo general de reacción de las lipasas (Dias *et al.*, 2011).

2.4 Hidrolasa de la Familia Serina de *Litopenaeus vannamei* (LvFSH)

La superfamilia de las serin hidrolasas (FSHs) es una de las clases de enzimas más extensas y diversas comprendiendo entre el 1-2% del total del proteoma en organismos superiores (Rajendran *et al*., 2020). Las enzimas que pertenecen a esta familia tienen la capacidad de hidrolizar una gran variedad de sustratos biológicos, ejemplos de estas enzimas son proteasas, esterasas, amidasas, transacilasas y lipasas, siendo las serin proteasas el grupo predominante de la familia, pero todas involucradas en importantes procesos metabólicos (Bun *et al*., 2020). Esta importancia despierta el interés por conocer las características bioquímicas y estructurales de las proteínas de esta familia que aún no han sido completamente descritas.

La LvFSH de *Litopenaeus vannamei* es una proteína homodimérica de 58 kDa con actividad tipo lipasa que se encontró tras la secuenciación y anotación de genes funcionales a partir de un transcriptoma reportado por Ghaffari *et al*., 2014. Dentro de este estudio el gen de lipasa encontrado es importante ya que hasta el momento se tenían sólo otros 2 genes identificados de lipasas en *L. vannamei*.

De los resultados de dicha colaboración, García-Orozco *et al*., 2019 se llevó a cabo un análisis bioinformático, bioquímico e inmunoquímico con el propósito de caracterizar esta proteína. Los análisis bioinformáticos realizados sobre la secuencia de aminoácidos mostraron que la proteína pertenece a las α/β hidrolasas, más específicamente la familia de serin hidrolasas. Se realizó un modelado por homología con el programa Phyre2 utilizando como templado a FSH1 de *S. cerevisiae* (PDB: 1YCD) la cual presentó el mayor porcentaje de identidad entre los distintos templados utilizados con un 25% (figura 13). El modelo reveló que la proteína presenta el plegado característico α/β hidrolasa, constando de 6 hebras β rodeadas por 6 hélices α, donde la tapadera que cubre el sitio activo la forman la hélice α2, una hélice α corta y un par de lazos.

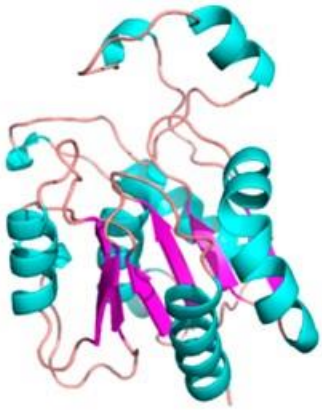


Figura 13. Modelo estructural de LvFSH (García-Orozco *et al.*, 2019).

Se sugiere que LvFSH se encuentra subcelularmente en la mitocondria, además de carecer de un péptido señal de excreción extracelular. También se encontró que posee una posible interacción con la proteína LDH1, una lipasa que participa en la movilización y homeostasis de lípidos en forma de gotas dentro de la célula. Aunado a lo anterior se hizo una inmunodetección de la proteína con el método de Dot Blot y ELISA en diferentes tejidos del camarón, siendo predominante en las branquias, mientras que el tejido digestivo presentó la menor concentración (García-Orozco *et al*., 2019).

La caracterización bioquímica mostró que tiene una alta actividad contra el *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA, C2) (k_{cat}=2.08 min^{-1}) y una afinidad baja (Km=1.01 mM). Cuando se probó su actividad contra el *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL, C12), la enzima mostró una actividad menor (k_{cat}=0.12 min^{-1}) y una mayor afinidad por el sustrato (Km=0.14 mM), esto demuestra que la enzima tiene actividad tanto con sustratos de cadena corta (ésteres) como de cadena larga (lípidos) (García-Orozco *et al*., 2019).

Toda esta información sugiere que más que una función digestiva, esta proteína está involucrada en el metabolismo intracelular de lípidos posiblemente hidrolizando TAGs en situaciones de demanda energética.

Si bien se ha dado un primer paso a la caracterización de esta proteína, aún hace falta obtener la información estructural de la misma, los resultados obtenidos en el anterior estudio que involucraron el uso del modelo generado por Phyre2 pueden verse cambiados si se utiliza una estructura generada experimentalmente ya que en el modelo teórico no existe certeza en la posición

de las cadenas laterales de los aminoácidos, lo que dificulta los estudios de interacción con otras moléculas (Kelley *et al*., 2015). La estructura cristalográfica de la proteína permitirá profundizar en el conocimiento del mecanismo de reacción de la enzima con los diferentes sustratos, así como en la función que esta tiene en el metabolismo del camarón, resaltando así su importancia en el organismo.

3. HIPÓTESIS

La estructura obtenida experimentalmente de la proteína de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) LvFSH, permitirá profundizar en el conocimiento del mecanismo de catálisis de la enzima y su función en el metabolismo de lípidos del camarón.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la estructura tridimensional mediante cristalografía de rayos X, de la proteína LvFSH, de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), con actividad enzimática tipo lipasa.

4.2 Objetivos Específicos

1. Obtener la proteína LvFSH por sobreexpresión heteróloga en células de *E. coli* BL21-SI.
2. Purificar la proteína a homogeneidad por cromatografía de afinidad a níquel y de interacción hidrofóbica.
3. Realizar ensayos de actividad lipasa usando un sustrato sintético de cadena larga (*p*-NPP, C16).
4. Cristalizar la proteína por el método de *microbatch* para realizar experimentos de difracción de rayos X.
5. Analizar datos de difracción de rayos X, mediante diversas herramientas informáticas para obtener la estructura tridimensional de LvFSH y afinar dicha estructura hasta obtener la versión que arroje los mejores parámetros estadísticos.
6. Comparar la estructura obtenida con la de otras enzimas homólogas para proponer la posible función de la proteína en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención y Purificación de LvFSH

Para la obtención y purificación de la proteína se siguió el protocolo establecido por García-Orozco *et al*., 2019. La proteína se obtuvo por expresión heteróloga utilizando una cepa transformada de *E. coli* BL21-SI que contiene el plásmido con la secuencia de aminoácidos de la proteína de estudio (GenBank XP_027218885.1). Primero se sembró un preinóculo en 5 mL de medio LB sin sal conteniendo ampicilina (100 μg/mL) y cloranfenicol (30 μg/mL), el cual se cultivó a 37 °C por 24 h con agitación constante (225 rpm). Posteriormente este se utilizó para inocular 100 mL de medio LB en las mismas condiciones por 24 h, el cual se utilizó como inóculo de 1L de medio LB el cual se cultivó en las mismas condiciones. Se monitoreó la densidad óptica (DO_{600}) hasta alcanzar un valor de 0.6, para inducir la sobreexpresión de la proteína con 1 mM isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) y 0.4 M NaCl, y se incubó por 24 h a 37 °C con agitación constante (225 rpm). Transcurrido el tiempo de crecimiento, la biomasa se recuperó centrifugando a 4000 rpm por 40 min a 4 °C. La biomasa se almacenó a -80 °C hasta su uso. Previo a la purificación la biomasa se resuspendió en solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl), y sonicada en baño de hielo con 4 pulsos de 10 s en un sonicador Branson S450-A (Connecticut, E. U.A.). Posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm, 4 °C, por 30 min, conservando el sobrenadante.

La purificación de la LvFSH, se llevó a cabo en dos pasos cromatográficos, utilizando un equipo de cromatografía de mediana presión ÄKTA (GE Healthcare®, Chicago, E.U.A.). Primeramente se llevó a cabo una Cromatografía por Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) utilizando una columna His-Trap HP de 5 mL equilibrada con 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl. Posteriormente la proteína unida a la columna se eluyó con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol. Las fracciones conteniendo la proteína de interés, se sometieron a un segundo paso de purificación mediante Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés), utilizando una columna de hidrofobicidad HiTrap Buthyl HP de 5 mL previamente equilibrada con buffer 50 mM fosfatos de sodio pH 7.4, 3M NaCl, la proteína unida a la matriz se eluyó por gradiente inverso de NaCl de 3 a 0 M y las fracciones conteniendo proteína se analizaron

por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras (LaemmLi, 1970). La concentración de proteína purificada se determinó por el método de ácido bicinconínico (Smith *et al*., 1985), utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina de 0.1-2 mg/mL. Finalmente, previo a la cristalización la proteína se sometió a un paso de pulido mediante una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) utilizando una columna Superdex® 200 10/300 GL previamente equilibrada con amortiguador 50 mM fosfatos de sodio, pH 7.4, 150 mM NaCl, al finalizar se seleccionaron y mezclaron las fracciones que contenían la proteína y se llevó a una concentración de 14 mg/mL por centrifugación utilizando un concentrador Amicon® de 30 kDa de corte, y filtrada a través de un filtro de 0.45 □m.

5.2. Ensayo de Actividad Enzimática

Se midió la actividad enzimática contra *p*-nitrofenil ésteres (*p*-nitrofenil laurato, *p*-NPL y *p*-nitrofenil palmitato, *p*-NPP) conforme a lo reportado por García-Orozco *et al*., 2019. La enzima se probó a 37 °C en amortiguador 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.2% (*v/v*) Triton X-100, 50 mM NaCl. Se prepararon soluciones de *p*-NPL y *p*-NPP a una concentración de 1 mM en etanol. Posteriormente se prepararon reacciones de 1.25 mL conteniendo 60 μg de enzima, 5 μL de la solución de sustrato a 10 mM y se completó el volumen con amortiguador de reacción en una celda de cuarzo con paso de luz de 1 cm. La reacción se monitoreó espectrofotométricamente a 410 nm en un espectrofotómetro UV de arreglo de diodos Agilent 8453 (Agilent Technologies, California, E.U.A.). Una unidad (U) de actividad lipasa se definió como la cantidad enzima requerida para producir 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto. Esto se calculó usando un coeficiente de extinción molar $\varepsilon_{410\ nm}$ = 12,750 cm^2/mmol.

5.3 Cristalización de LvFSH

Se utilizó el método cristalización en *microbatch*, el cual se realizó en microplacas de polipropileno

de 96 pozos de fondo cóncavo, y se utilizaron las condiciones 54 y 65 del kit Index® de Hampton Research. En cada pozo, se colocaron 1 μL de la muestra de proteína LvFSH (10 mg mL^{-1}) y 1 μL de la solución de condición. Finalmente se agregaron 10 μL de aceite de parafina para cubrir la gota, la placa se tapó y se colocó en una cámara a 15 °C con control de humedad y libre de vibraciones. Se monitoreó la formación de cristales semanalmente utilizando un estereomicroscopio EMZ13-TR® (Meiji Techno, Saitama, Japón).

5.4 Optimización de la Cristalización

Con el fin de mejorar los cristales obtenidos se realizó una optimización de las condiciones de cristalización, modificando el pH de la condición 54 del kit Index™ de Hampton Research. Se realizaron experimentos a pH 6, 7 y 8, para este último se utilizó 0.5 M cloruro de calcio dihidratado, 0.1 M Bicine/Trizma, pH 8, 30% (*v*/*v*) PEG monometil éter 550. En cada pozo se colocó 1 μL de proteína a una concentración de 14 mg mL^{-1} y 1 μL de solución de condición, cubriendo con 10 μL de aceite de parafina. Los experimentos se realizaron a 15 y 25 °C.
También se realizaron pruebas de cristalización de la proteína con el inhibidor de lipasas Orlistat, para esto 100 μL de proteína (14 mg mL^{-1}) se incubaron con 2 μL de Orlistat (150 mM) a 4 °C por 1 h. Posteriormente se montaron placas de cristalización como se describió anteriormente.

5.5 Análisis de Datos de Difracción de Rayos X.

Los cristales utilizados en este procedimiento fueron obtenidos de experimentos preliminares de cristalización hechos por el Laboratorio de Estructura Biomolecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Estos se colectaron y montaron en lazos como lo muestra el ejemplo de la figura 14, para posteriormente ser súper-enfriados con nitrógeno líquido (100 K), para lo cual se utilizaron soluciones crioprotectantes para evitar la formación de cristales de hielo. Estas se prepararon previamente con la solución de cristalización y glicerol en diferentes concentraciones (10 – 30%).

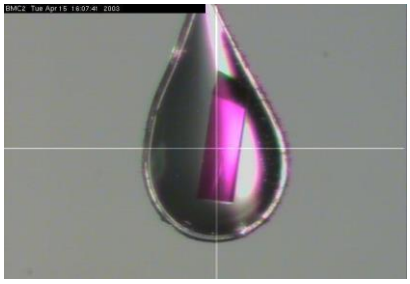


Figura 14. Ejemplo de cristal montado en lazo (*loop*) previo a un experimento de difracción con rayos X.

Posteriormente se realizaron experimentos de difracción por parte del Laboratorio de Estructura Biomolecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., en la línea (*beamline*) 14-1 del Laboratorio de Radiación Sincrotrón de Stanford en California, E. U. A. Se utilizó un detector MARmosaic325 CCD con una longitud de onda de 1.181 Å. Se determinó el grupo espacial ($P3_1$) y posteriormente se colectaron datos girando el cristal 0.5 grados hasta un total de 180 grados con un tiempo de exposición de 13 s. Se colectaron 360 imágenes (difractogramas) que se utilizaron para los análisis computacionales posteriores. Los datos obtenidos de dicha colecta se analizaron mediante los programas *iMosflm*, *Pointless*, *Matthews_Coef*, y *Scala* del paquete computacional CCP4 (Collaborative Computation Proyect No. 4) (Winn *et al*., 2011).

5.5.1 *iMosflm*

Este programa se encarga de analizar las imágenes (difractogramas) obtenidos del experimento de difracción de rayos X. Primeramente, las imágenes con los difractogramas se introdujeron al programa, donde se analizaron para indizar los distintos puntos de difracción en cada imagen, aquí se define el límite de resolución (Å) y grupo espacial del cristal, posteriormente estos puntos se integran dentro del mismo programa, para generar un archivo `.mtz` con las intensidades de todos los puntos.

5.5.2 *Pointless*

Utilizando este programa es posible comprobar si el grupo espacial obtenido por el programa iMosflm es el correcto, para esto se introdujo el primer archivo `.mtz`, y se generó un reporte donde el programa nos arroja el grupo espacial más adecuado.

5.5.3 *Scala*

Aquí se realiza el escalamiento de las intensidades a amplitudes, para esto es necesario ingresar el archivo .mtz generado por *iMosflm* y se genera un nuevo archivo .mtz que se le denomina "escalado".

5.5.4 *Matthews_Coef*

El coeficiente de Matthews y contenido de solvente se calcularon a partir de la celda unidad y el peso molecular de LvFSH. Para este paso se ingresó manualmente la siguiente información: los parámetros de celda (a = 113.28, b = 113.28, c = 44.2; α = 90, β = 90, γ = 120), el grupo espacial ($P3_2$), peso molecular de la proteína (27 kDa), y el límite de resolución (3.03 Å). Aquí no se genera un archivo, sólo se determina el número de moléculas que están dentro de la unidad asimétrica.

5.6 Generación y Afinamiento del Modelo Estructural de LvFSH

Para la resolución de las fases teóricas, generación y afinamiento del modelo tridimensional se utilizan los programas *phaser* y *phenix.refine* del paquete computacional PHENIX (Python-based

Hierarchical for Integrated Xtallography) (Adams *et al.*, 2011), y la interfaz gráfica Coot (Emsley, 2010).

5.6.1 *Phaser*

El programa *phaser* se encarga de realizar el reemplazo molecular. Este programa genera las fases faltantes en el experimento a partir de un modelo estructural de proteína similar a la que se está analizando, cabe mencionar que la identidad a nivel secuencia de aminoácidos debe ser mínimo del 30%. Con esto se genera un mapa de densidad electrónica dentro del cual se insertan los aminoácidos que corresponden provenientes de la secuencia peptídica de la proteína de estudio. Para este proceso se utilizó lo siguiente:

- El archivo .mtz escalado.
- La estructura de la proteína molde en formato PDB (1YCD).
- El porcentaje de identidad entre las dos proteínas (25%).
- La secuencia de aminoácidos de la proteína de estudio.
- Número de moléculas dentro de la unidad asimétrica (3).

5.6.2 *Phenix.refine*

Para finalizar se realizó el afinamiento de la estructura en el programa *Phenix.refine*, en conjunto con el programa Coot. Durante esta etapa se buscó llegar a los mejores parámetros estadísticos, primero haciendo modificaciones manuales con la interfaz Coot y posteriormente haciendo ciclos de afinamiento automáticos con *Phenix.refine*. Durante esta etapa, se prestó atención a los factores estadísticos R (R_{free} y R_{work}), los cuales al disminuir indican un cambio favorable en el modelo estructural.

5.7 Análisis de Cargas Superficiales

Con el fin de observar y analizar los potenciales electrostáticos de la superficie de la proteína en diferentes condiciones, se utilizaron los servidores en línea de los programas PDB2PQR (Dolinski *et al*., 2007) y APBS (Baker *et al*., 2001) ambos disponibles en: server.poissonboltzmann.org. Primeramente se procesó la estructura para obtener los parámetros requeridos para la obtención del campo de potenciales electrostáticos (reconstrucción de átomos, agregar hidrógenos, asignación cargas y radios de campos de fuerza específicos) dentro del servidor en línea de PDB2PQR, donde se cargó la estructura en formato .pdb, se definió el pH (6-11), y se ejecutó el programa con los valores predeterminados. Una vez finalizó se continuó de manera subsecuente a la generación del mapa de potencial electrostático con el servidor de APBS, utilizando los valores predeterminados. Como resultado se obtuvo un mapa de potencial electrostático en formato .dx, el cual se utilizó para visualizar y analizar las cargas superficiales de la proteína en el programa UCSF Chimera.

5.8 Acoplamiento Molecular (*Docking*)

Para observar las interacciones de la proteína con distintos sustratos se realizó una prueba de acoplamiento con el programa en línea SwissDock (www.swissdock.ch) (Grosdidier *et al*., 2011). Para esto se utilizaron: un archivo con la estructura de la proteína en formato .pdb y el ligando que se va a acoplar a la proteína. Este último puede ser introducido con un código de la base de datos ZINC 15 (http://zinc.docking.org/) (Sterling e Irwin, 2015), en caso de que el ligando no esté disponible este debe modelarse en un archivo .mol2 para ser introducido al programa. Se utilizó un archivo con la proteína como monómero, y se probó el acoplamiento contra 4 ligandos con distintos largos de cadena: *p*-NPA (código ZINC: 000001641045), *p*-NPB, *p*-NPL, *p*-NPP (código ZINC: 000076945641), los sustratos no disponibles se introdujeron en formato SMILES en OpenBabel (O'Boyle *et al*., 2011) y convertidos a formato Mol2. Se establecieron parámetros adicionales centrando el experimento en las coordenadas correspondientes al O^- de la cadena lateral de la serina catalítica (Ser111), y se estableció un volumen de búsqueda de 15 $Å^3$. Los resultados se

visualizaron y analizaron con el programa UCSF Chimera (Petersen *et al*., 2004).

5.9 Comparación Estructural

Con el fin de comparar las características estructurales de LvFSH se realizó una búsqueda de homólogos en el servidor en línea DALI (http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/) (Holm, 2020), introduciendo al programa la estructura en formato .pdb, dentro del apartado "*PDB search*". Los resultados se analizaron dentro del mismo servidor y con el programa UCSF Chimera (Petersen *et al*., 2014).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Expresión y Purificación de LvFSH

La proteína recombinante LvFSH de camarón blanco se expreró exitosamente de forma soluble (figura 15), utilizando la cepa de *E. coli* BL21-SI. Esta cepa permite la sobreexpresión de proteínas por cambios en la presión osmótica, y contiene el plásmido con la secuencia de la proteína bajo el control del promotor T7, por lo que son necesarios tanto NaCl como IPTG para inducir la sobreexpresión (Donahue y Bebee, 1999).

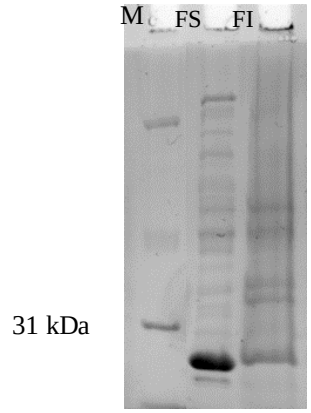


Figura 15. Sobreexpresión de LvFSH recombinante (27 kDa) 24 h post inducción. M=Marcador de peso molecular; FS: Fracción de proteína soluble; FI: Fracción de proteína insoluble.

La biomasa obtenida se recuperó por centrifugación, se lisó por sonicación, y posteriormente el sobrenadante se sometió a una cromatografía por afinidad a níquel. A pesar de ser un método altamente específico para la purificación de proteínas recombinantes con etiqueta de histidinas, es posible observar en la figura 16a, que la proteína es eluida al comienzo del gradiente de imidazol (40 mM), cuando típicamente esto sucede más adelante. En ocasiones es posible que la etiqueta de histidinas no quede correctamente expuesta en la superficie de la proteína, lo que conlleva a una unión débil con la matriz (Bornhorst y Falke, 2000).

Para aumentar la pureza se realizó un segundo paso de purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), este tipo de cromatografía permite separar proteínas por el grado de hidrofobicidad que estas poseen (Queiroz *et al*., 2001). Después de este paso se obtiene la proteína de interés con una mayor pureza (figura 16b), las lipasas al poseer una mayor afinidad por sustratos hidrofóbicos se unen con mayor fuerza a la matriz, lo que permite separarlas del resto de las proteínas.

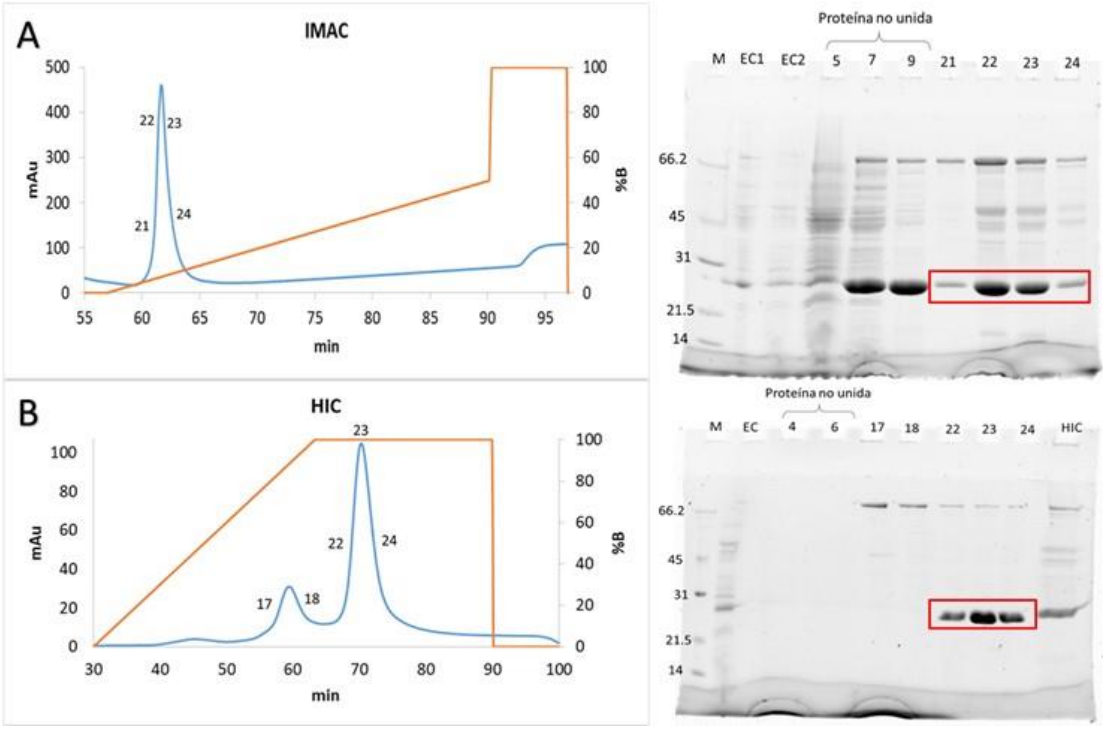


Figura 16. Purificación de LvFSH. (A) Cromatograma de purificación de LvFSH por afinidad a níquel (IMAC) y su respectivo SDS-PAGE. (B) Cromatograma de purificación de LvFSH por interacción hidrofóbica (HIC) y su respectiva SDS-PAGE. En SDS-PAGE: M=Marcador de peso molecular; EC= Extracto crudo; HIC=Muestra inyectada. Recuadro rojo señalando bandas de interés.

6.2 Ensayo de Actividad Enzimática

Con el fin de comprobar la presencia de la enzima activa se midió la actividad de LvFSH contra *p*-NPL (C12), según el procedimiento reportado por García *et al*., 2019. Además se midió la actividad

contra el sustrato *p*-NPP (C16) (cuadro 1). La enzima mostró actividad contra *p*-NPP, apoyando la noción de la preferencia de esta enzima por lípidos de cadena larga. Se ha observado que las lipasas pueden presentar especificidad por el tamaño de la cadena alifática de su sustrato (Jensen *et al*., 1983; Song *et al*., 2008). La selectividad por sustratos de cadena larga ha sido observada en lipasas de otras especies, como *Rhizopus oryzae* y *Thricosporon capitatum* (Song *et al*., 2003), *Rizomucor miehei* (Oh *et al*., 2001) y *Rizopus chinensis* (Yu *et al*., 2009). Esta especificidad es atribuible a distintas características estructurales de estas enzimas, por ejemplo el agujero oxianión, el dominio tapadera, y la cavidad del sitio activo (Casas-Godoy *et al*., 2018; Santarossa *et al*., 2005; Yang *et al*., 2002). En LvFSH estas características se abordan más adelante a profundidad.

Cuadro 1. Actividad de LvFSH contra dos sustratos.

Sustrato	Actividad específica (U/mg de proteína)
p-nitrofenil Laurato (C12)	35.66 ± 40.78
p-nitrofenil Palmitato (C16)	0.000579 ± 0.00049

Antes de continuar con la cristalización de la proteína se realizó un paso de pulido con cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), para asegurar la mayor pureza posible de la muestra antes de hacer las pruebas de cristalización. Este tipo de cromatografía permite la separación de proteínas por su peso molecular al interaccionar con la matriz porosa de la columna, las moléculas de menor peso tienen una interacción mayor lo que las retiene, mientras que las de mayor tamaño pasan por la columna con mayor facilidad (Hagel, 2011). Se consiguió obtener y purificar de manera satisfactoria la proteína LvFSH con los métodos reportados por García-Orozco *et al*. en 2019.

6.3 Cristalización de LvFSH

Haciendo uso de la técnica de *microbatch* se obtuvieron cristales en la condición 54 (0.05 M cloruro de calcio dihidratado, 0.1 M BIS-Tris, pH 6.5, 30% (*v/v*) PEG monometil éter 550 del kit Index (Hampton Research) (figura 17).

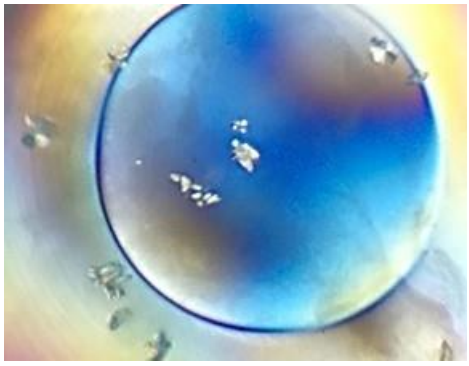


Figura 17. Cristales de LvFSH obtenidos utilizando la condición 54 del kit Index (Hampton Research).

6.4 Optimización de la Cristalización

Con el fin de obtener cristales de mejor calidad se buscó optimizar las condiciones de cristalización, mediante la modificación del pH o la adición del inhibidor Orlistat. Se obtuvieron cristales de diversas formas en las condiciones probadas (figuras 18, 19).

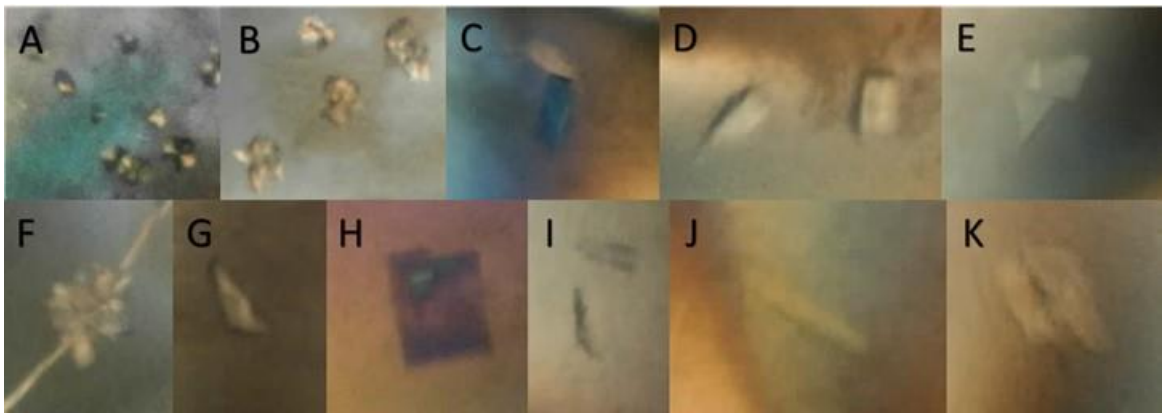


Figura 18. Optimización de cristalización de la proteína LvFSH a partir de la condición 54 Index conteniendo 0.05 M cloruro de calcio dihidratado, 0.1 M BIS-Tris, 30% (*v/v*) PEG monometil éter 550. A y B, pH 6; C, pH 6.5; D y E, pH 7. F y G, pH 6 con Orlistat; H e I, pH 6.5 con Orlistat; J, pH 7 con Orlistat; K, pH 8 con Orlistat. Placas incubadas a 25 °C.

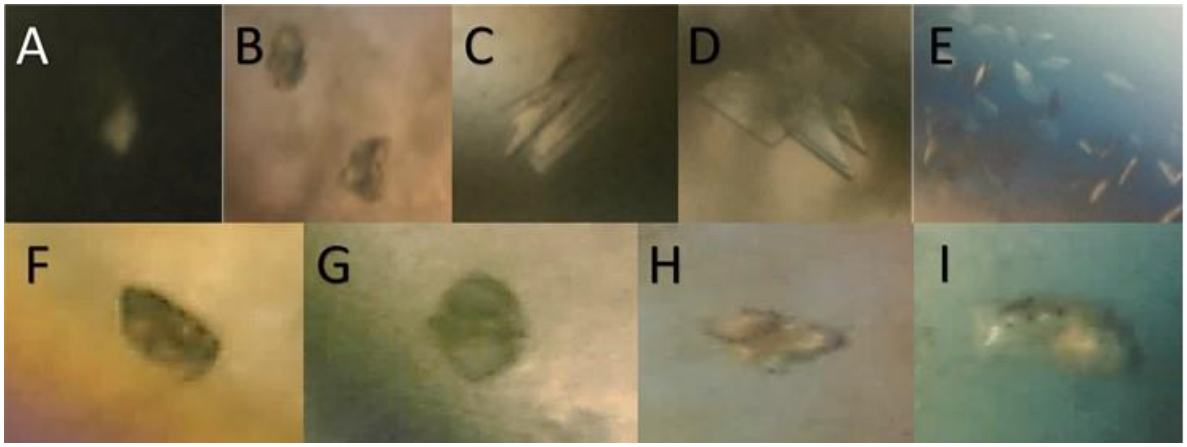


Figura 19. Optimización de cristalización de la proteína LvFSH a partir de la condición 54 Index® conteniendo 0.05 M cloruro de calcio dihidratado, 0.1 M BIS-Tris, 30% (*v/v*) PEG monometil éter 550. A y B, pH 6; C, pH 7; D y E, pH 8. F y G, pH 6 con Orlistat; H, pH 7 con Orlistat; I, pH 8 con Orlistat. Placas incubadas a 15 °C.

6.5 Análisis de Datos Cristalográficos

Los difractogramas utilizados en este estudio se obtuvieron de experimentos preliminares de cristalización y difracción de rayos X hechos por el Laboratorio de Estructura Biomolecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Estos se analizaron con los paquetes computacionales CCP4 y PHENIX.

Las imágenes se indizaron a 3 Å de resolución y posteriormente integradas con el programa *iMosflm*. El archivo `.mtz` con las intensidades generado por *iMosflm* se escaló a continuación con el programa Scala, y se utilizó el programa *Mathews_coef* para encontrar el número de moléculas dentro de la unidad asimétrica, para finalmente obtener los parámetros estadísticos del *dataset* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Parámetros estadísticos. Valores entre paréntesis son los resultados en la última franja.

Grupo espacial	$P3_2$
Parámetros de celda unidad ***a, b, c* (Å)** ***α, β, γ* (grados)**	 113.28, 113.28, 44.2 90, 90, 120
Rango de resolución (Å)	37.08 – 3.03 (3.19 – 3.03)
No. de reflexiones	72145 (10528)
No. de reflexiones únicas	12308 (1810)
Integridad (%)	100 (100)
$CC_{1/2}$ (%)	98.6 (46.8)
I/σ(I)	9.3 (2)
Multiplicidad	5.9 (5.8)
Monómeros en unidad asimétrica	3

Dentro de la cuadro 2 los parámetros I/σ(I) y $CC_{1/2}$ nos permiten saber si se hizo un corte (*cutoff*) adecuado de la resolución (Å) de los datos, cuando observamos sus valores en la última franja. I/σ(I) indica cuántas veces están los datos por encima del ruido experimental, el valor mínimo adecuado es 2; $CC_{1/2}$ es un es un parámetro que muestra el grado de correlación que existe entre las intensidades de una mitad del *dataset* con la otra, a partir de 35% se observa que hay una buena correlación de los datos (Evans y Murshudov, 2013).

6.6 Gemelitud (*twinning*)

Durante el proceso de indización e integración, al tratar de encontrar el grupo espacial correcto se presentaron dificultades, y al correr Pointless, el programa mencionaba la posible gemelitud (*twinning*) del cristal.

La gemelitud es una anomalía en el crecimiento del cristal, donde este, está compuesto por dos dominios cristalinos cuyas orientaciones difieren una con la otra. Es un problema común en la cristalografía de proteínas, análisis hechos a las estructuras del PDB revelaron que

aproximadamente el 30% de las celdas unidad reportadas presentan gemelitud (Lebedev *et al.*, 2006). Existen diferentes problemas en el crecimiento del cristal, pero la gemelitud hace referencia a casos donde las direcciones de las distintas redes cristalinas (*crystal lattice*) son paralelas. Esto lleva a una coincidencia parcial o total entre las redes de los diferentes dominios (Yeates, 1997). Esta superposición de redes cristalinas complica la estimación de los factores estructurales a partir de las intensidades observadas (Thompson, 2017).

Existen dos tipos de gemelitud: la macroscópica (no merohedral) y la microscópica (merohedral). En el primer caso es posible observar múltiples cristales creciendo en forma de conglomerado, apareciendo cristales creciendo uno sobre otro en orientaciones aleatorias (figura 20). En estos casos no hay relación entre los distintos cristales por lo que no se considera una gemelitud real.

Figura 20. Ejemplo de un cristal que presenta gemelitud macroscópica, donde los cristales crecen sobrepuestos de forma aleatoria. Cuando estos son iluminados por rayos X, cada cristal difracta de forma independiente, mostrando un patrón de difracción propio de cada cristal (Thompson, 2017).

Este tipo de gemelitud es detectable de manera visual y usualmente se soluciona separando uno de los cristales físicamente con una aguja o un lazo, para posteriormente colectarlo.

La gemelitud merohedral describe una situación donde los dominios gemelos están orientados de tal forma que ambos dominios quedan perfectamente superpuestos (Parsons, 2003). Esto sólo es posible cuando se cumplen dos condiciones: la simetría rotacional de la red cristalina debe ser mayor a la del grupo espacial, y los dominios gemelos deben estar relacionados por una operación de simetría a nivel de la red cristalina pero no del grupo espacial. Esto es posible para ciertos grupos espaciales en las redes tetragonal, trigonal, hexagonal y cúbica.

Dentro de esta clasificación está la gemelitud “hemihedral”, que es la más común en la cristalografía de macromoléculas (Yeates, 1999). Este consiste en dos dominios gemelos, normalmente relacionados por una rotación de 180° (figura 21). Los patrones de difracción generados por cristales con estas características tienden a presentar intensidades más fuertes de lo usual, e incumplen además con las reglas de desviación características de los puntos de difracción de un difractograma (Rupp, 2010).

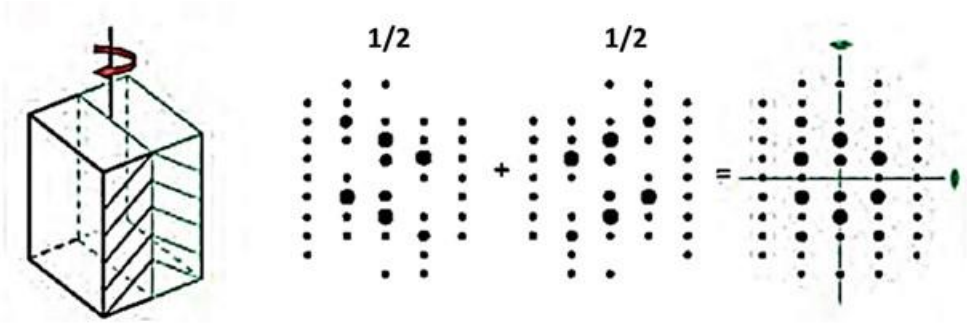


Figura 21. Esquema de gemelitud hemihedral de un cristal. Al superponerse los patrones de difracción se produce un aumento en la intensidad de los puntos difractados y una disminución en la desviación (Rupp, 2010).

Cuando se trabaja con un cristal gemelo es importante tener en cuenta dos aspectos matemáticos conocidos como el operador gemelo y la fracción gemela. El operador gemelo es la operación de simetría que relaciona los dos dominios del cristal, que como se mencionó con anterioridad debe aplicarse a la red cristalina no al grupo espacial. La fracción gemela (α) cuantifica la fracción del volumen del cristal ocupada por el dominio más pequeño, este valor está entre 0 y 0.5, y la fracción mayor ocupa el resto del espacio (1-α). Además de describir los volúmenes en el espacio real, la fracción gemela se manifiesta en el espacio recíproco. Esto debido a que cada dominio del cristal difracta rayos X de forma independiente y proporcional a su volumen, por lo que cada intensidad observada proveniente de un cristal gemelo es una combinación de las intensidades provenientes de cada fracción (Thompson, 2017). La contribución de cada dominio en las intensidades depende de su fracción gemela, y puede ser descrita por las siguientes ecuaciones:

$$I_1 = \alpha J_1 + (1 - \alpha) J_2 \quad (3)$$

$$I_2 = (1 - \alpha) J_1 + \alpha J_2 \quad (4)$$

Donde I_1/I_2 son intensidades de dos reflexiones relacionadas por un operador de gemelitud, α corresponde a la fracción gemela, y J_1 y J_2 son las intensidades "verdaderas" para las mismas dos reflexiones de un cristal no gemelo.

Existen acercamientos computacionales que permiten determinar si existe gemelitud en un conjunto de datos, como los programas *CTRUNCATE* de la suite CCP4 o *phenix.xtriage* de la suite PHENIX. Estos programas además de confirmar la presencia de gemelitud, calculan tanto la fracción gemela como el operador gemelo correspondientes.

En este trabajo se utilizó el programa *phenix.xtriage*, el cual confirmó que el cristal presenta gemelitud (figura 22).

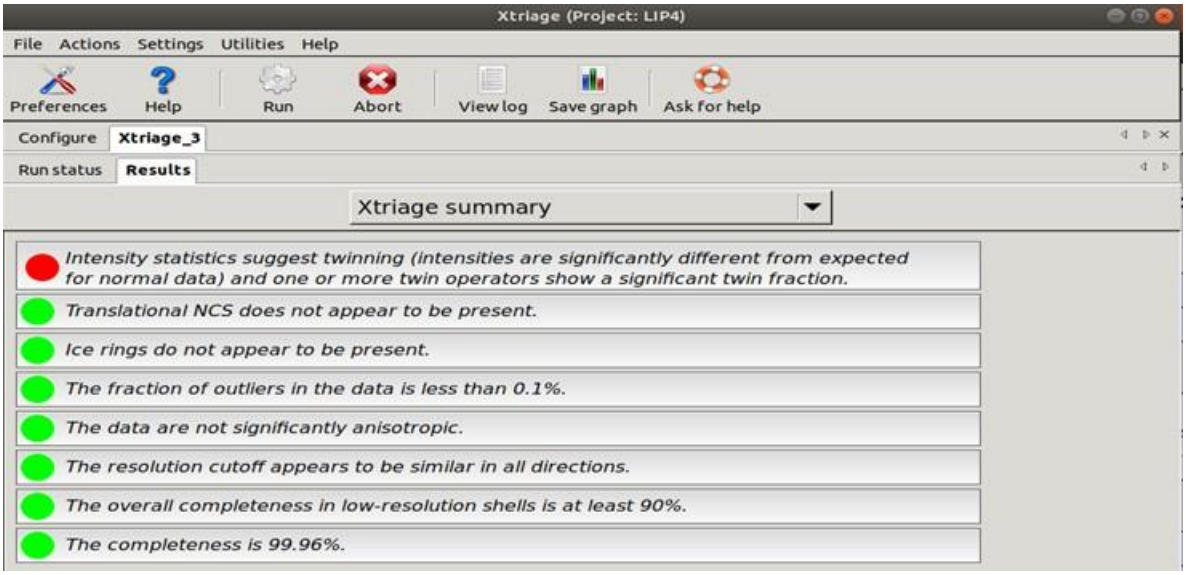


Figura 22. Resultados del análisis *phenix.xtriage*, en PHENIX de los datos experimentales.

También se calcularon la fracción gemela (α = 0.485) y los posibles operadores gemelos ([-k, -h, -l]; [-h, -k, l]; [h, -h-k, -l]). El resultado de la fracción gemela sugiere que el acercarse el valor a 0.5 se está trabajando con un cristal gemelo perfecto, esto genera problemas cuando se resuelven las fases por reemplazo molecular.

6.7 Resolución de Fases y Afinamiento del Modelo de LvFSH

La resolución de fases por reemplazo molecular (RM), se realiza utilizando una estructura previamente determinada, la cual se acomoda dentro de la celda unidad por funciones de rotación y traslación, con el objetivo de generar las fases teóricas que permitirán obtener el primer modelo de la estructura de la proteína. Este método es el más utilizado y es posible realizarlo en presencia de gemelitud. La principal función afectada por la gemelitud es la rotación, sin embargo, el programa *PHASER* realiza una prueba interna de gemelitud y corrige dicha función por lo que es posible realizar el RM con esta técnica a partir de datos con gemelitud (McCoy *et al*., 2007).
Para realizar el RM se introdujeron el archivo .mtz escalado, la secuencia fasta y la estructura del modelo con mayor identidad al programa *phaser*. Se consiguió resolver las fases (Cuadro 3) utilizando FSH1 de *S. cerevisiae* (Código PDB: 1YCD) como templado, el cual posee una identidad del 25% con la proteína de estudio.

Cuadro 3. Parámetros estadísticos de la resolución de fases teóricas.

LLG	35.63
TFZ	5.7

El estadístico LLG (Log Likelihood Gain) indica que para que la resolución de fases es positiva cuando el valor es mayor a 0, sin embargo el valor TFZ (Translation Function Z score) dicta que en el rango de 5 – 6 es poco probable que las fases se hayan resuelto satisfactoriamente.
El principal problema que causa la gemelitud perfecta en este caso es que dificulta la determinación del grupo espacial correcto, lo que provoca que los datos sean procesados en una simetría mayor a

la verdadera. Esto provoca que el reemplazo falle, de una solución parcial, o valores-R muy altos (McCoy, 2017). Aunado a esto la baja resolución de los datos y la baja homología de la proteína templado para el reemplazo molecular, contribuyen al aumento en el error del análisis.

El afinamiento de la estructura generada se realizó de manera automatizada con el programa *phenix.refine* haciendo uso del operador gemelo correspondiente (-k, -h, -l), y se hicieron ajustes manuales con el programa *Coot*. Tras los procesos de afinamiento la estructura alcanzó valores de 0.3140 para R_{work} y 0.4024 para R_{free}, los cuales son mayores a los aceptados para estructuras depositables en el Banco de Datos de Proteínas (0.20 para R_{work} y 0.25 para R_{free}).

6.8 Estructura de LvFSH

En la estructura de LvFSH (figura 23) se observa el plegamiento α/β hidrolasa con un núcleo de 4 hebras-β rodeado por 5 hélices-α. La topología de las estructuras secundarias es β1, α1, α2, β2, α3, β3, β4, α4, α5 del N terminal al C terminal.

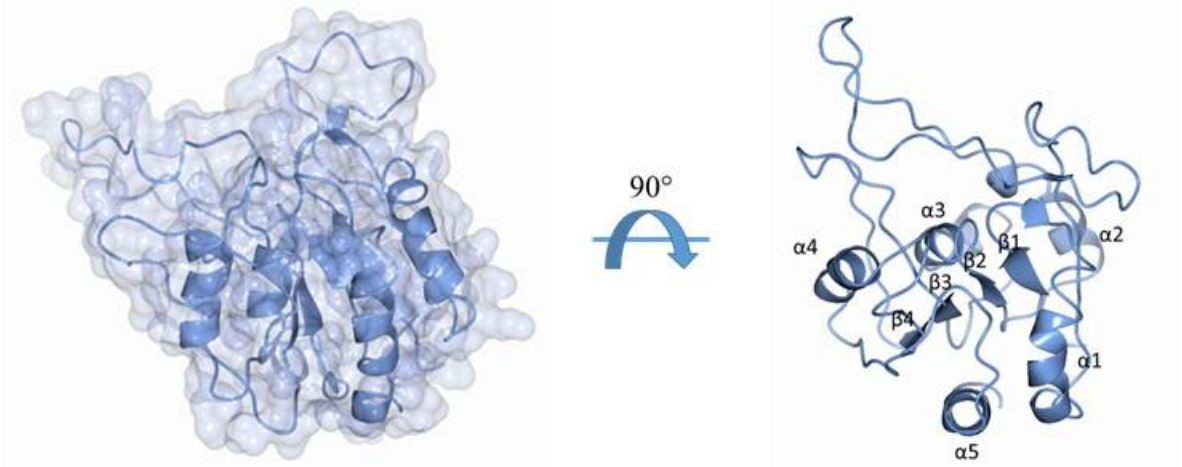


Figura 23. Estructura tridimensional de la proteína LvFSH obtenida del análisis de datos experimentales obtenidos previamente por el Laboratorio de Estructura Biomolecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

El plegado α/β hidrolasa está presente en varias enzimas con diferentes funciones en distintos

organismos. Las enzimas de esta familia tienen los residuos de la tríada catalítica localizados en lazos, localizándose el nucleófilo en el "codo nucleofílico". Esta estructura es apreciable en LvFSH localizándose en el lazo localizado entre β2 y α3 (Gly109-Phe110-Ser111-Gln112-Gly113) (figura 24a), y la tríada catalítica se completa con Asp169 e His196 (figura 24b), que también se encuentran en lazos.

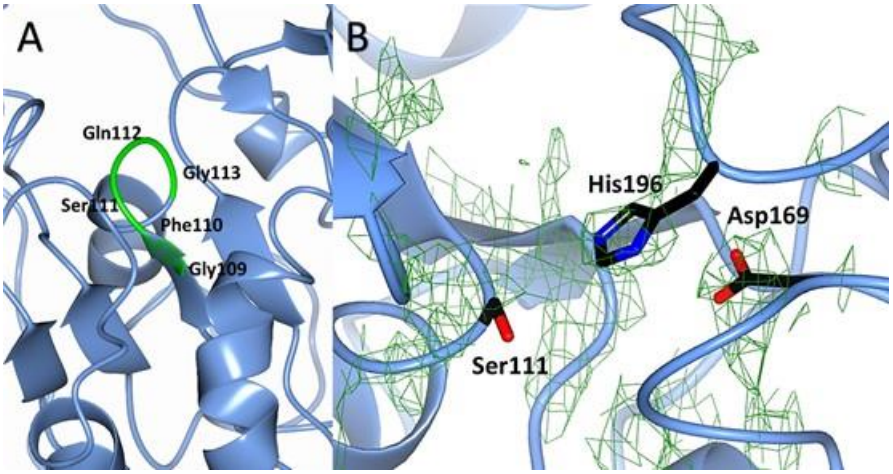


Figura 24. (A) Codo nucleofílico de LvFSH. (B) Tríada catalítica conservada (Ser111, Asp169, His196) con su respectivo mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc (Contorno a 1.5σ).

6.8.1 Agujero Oxianión

El agujero oxianión es una estructura crucial en las lipasas que permite la estabilización del compuesto intermedio acil-enzima durante la catálisis y promueve la interacción del sustrato con la tríada catalítica (Pihko *et al*., 2009). Esta estructura se encuentra típicamente se encuentra en la vecindad del sitio activo (Lee *et al*., 2006; Mandrich *et al*., 2009; Tsurmura y Tsuge, 2014). En las lipasas el primer residuo de esta estructura se encuentra en la secuencia consenso G-X1-S-X2-G, siendo X2 el residuo del agujero oxianión. El segundo residuo se encuentra hacia el N-terminal (Gupta *et al*., 2015). En la estructura de LvFSH se observan estas características siendo el agujero

oxianión compuesto por los aminoácidos Tyr18 y Gln111 (figura 25). Así mismo se ha clasificado a las lipasas por las características de su agujero oxianión encontrándose tres grupos: GX, GGGX e Y (Pleiss *et al*., 1998). LvFSH forma parte de las lipasas del grupo GX, donde se encuentra un dipéptido conservado compuesto por una glicina seguido por un aminoácido agujero oxianión (Gly17-Tyr18 en el caso de LvFSH) (figura 25).

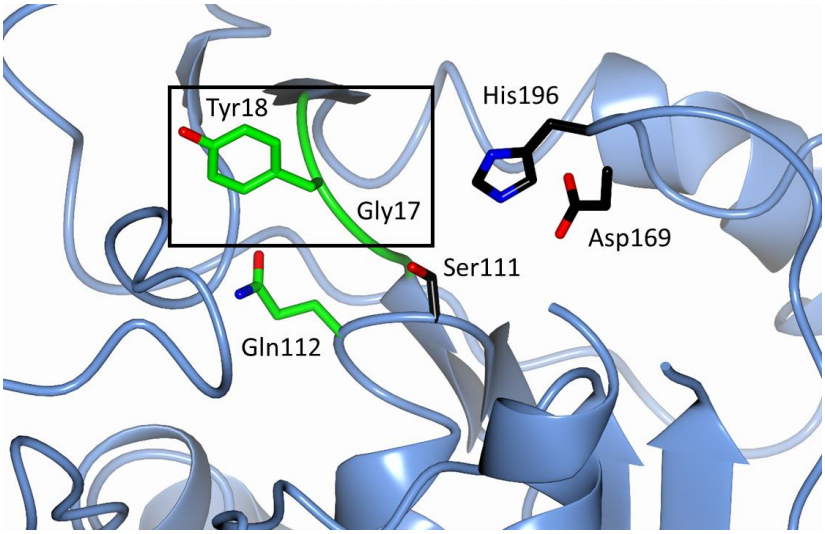


Figura 25. Agujero Oxianión (verde) de LvFSH. Recuadro negro muestra el dipéptido conservado GX (Gly17-Tyr18).

El tipo de agujero oxianión de las lipasas juega un papel importante en la especificidad de las mismas por un sustrato, y se ha reportado que las lipasas con el tipo GX hidrolizan preferentemente sustratos de cadena media o larga (Albayati *et al*., 2020). Esto ha sido observado de forma experimental en LvFSH, donde al evaluar su actividad contra dos sustratos sintéticos, uno de cadena corta (*p*-NPA) y otro de cadena larga (*p*-NPL), la enzima mostró una mayor afinidad por el *p*-NPL (García-Orozco *et al*., 2019).

6.8.2 Dominio Tapadera (*Lid*)

Una característica central de las lipasas es que su actividad aumenta más allá de la concentración

crítica micelar del sustrato (Cambillau, 1996). Este fenómeno de "activación interfacial" es debido a la presencia de una estructura anfipática conocida como tapadera (lid). Esta estructura se encuentra sobre el sitio activo de la enzima impidiendo el acceso del sustrato en su conformación cerrada, y es desplazado al entrar en contacto con las micelas de sustrato para dar paso al sustrato (Barbe *et al*., 2009).

Esta estructura está presente en la mayoría de las lipasas, aunque en algunos casos puede no estar presente. Khan *et al*. (2017) hicieron un análisis de 149 estructuras de 44 lipasas reportadas en el PDB y las clasificaron en 3 grupos: lipasas sin tapadera (1), lipasas cuya tapadera consta de un lazo o una hélice (2), y lipasas cuya tapadera posee dos o más hélices (3). Además encontraron algunas características atribuibles a esta clasificación, como que las lipasas que mostraban una mayor termoestabilidad tienen una tapadera con dos o más hélices en su estructura. La lipasa LvFSH posee un dominio tapadera formada por un lazo (figura 26), constando de 14 aminoácidos (Glu50 – Gly63).

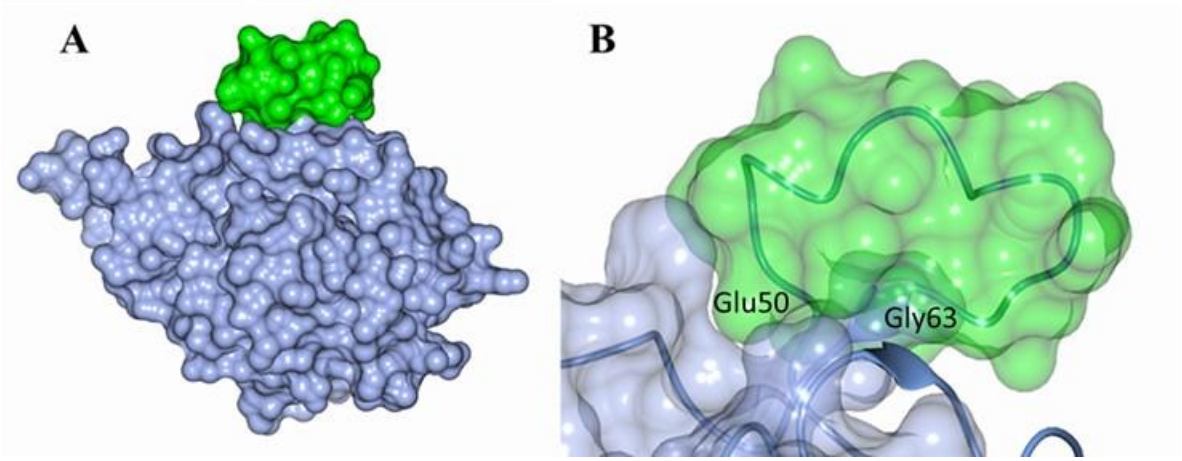


Figura 26. Estructura del lazo o tapadera identificada en la estructura obtenida de la proteína LvFSH. En verde, dominio tapadera conformado por un lazo (Glu50 – Gly63).

Las características de la tapadera de la lipasa LvFSH de *L. vannamei* la situarían en el grupo 2. Ha sido reportado que la estructura tapadera juega un papel importante en la especificidad de las enzimas lipasas por un sustrato (Dugi *et al*., 1995; Brocca *et al*., 2003; Santarossa *et al*., 2005; Panizza *et al*., 2015). Aunado a esto en los análisis hechos por Khan *et al*., en 2017, encontraron que las lipasas con actividad mono y diacilglicerol hidrolasa analizadas en este estudio tienen una

tapadera compuesta por una hélice o lazo. Se necesitarían hacer pruebas para comprobar si la LvFSH posee actividad mono o diacilglicerol hidrolasa.

6.8.3 Análisis de Cargas Superficiales

Las cargas electrostáticas son las más influyentes en fenómenos pH dependientes. Esto es apreciable en las proteínas en ciertos aminoácidos que poseen carga conocidos como aminoácidos titulables (Lys, Arg, His, Glu, Asp, Tyr, Cys), los cuales bajo ciertas condiciones de pH pueden llevar carga positiva o negativa. Dichas cargas pueden afectar directamente en las interacciones que tiene una proteína. Por lo tanto, el pH es un factor clave en la actividad enzimática. Los potenciales eléctricos de aminoácidos titulables juegan un papel importante en la catálisis ya que pueden favorecer la unión del sustrato, estabilizar estados de transición y asistir en la liberación del producto (Petersen *et al*., 2001).

Esto en las lipasas se observa de dos maneras: en la unión del sustrato al sitio activo y en la liberación de los ácidos grasos hidrolizados. En el primer fenómeno se ha observado que las cargas de los aminoácidos en la cavidad y el entorno de la cavidad del sitio activo juegan un papel importante en la eficiencia catalítica de la enzima. Cuando se presentan cargas negativas en estos sectores se da una mayor afinidad por el sustrato y aumenta la actividad de la enzima, variando en función del pH (Fojan *et al.*, 2000). El segundo fenómeno se ha observado tanto en esterasas como lipasas, donde se ha observado que las cargas negativas en el sitio activo de estas enzimas promueven la expulsión del producto mediante un mecanismo de "catapulta electrostática" debido a la repulsión de cargas entre el sitio activo y el ácido graso cargado negativamente (Petersen *et al*., 2001).

Con el fin de estudiar este fenómeno en LvFSH se analizó el potencial electrostático superficial utilizando los servidores PDB2PQR y APBS. Para observar el efecto del pH en la distribución de cargas se realizaron los análisis a pH 6, 8, 10 y 11. Los potenciales electroestáticos presentes en la superficie de LvFSH a diferentes pH, son presentados en la figura 27.

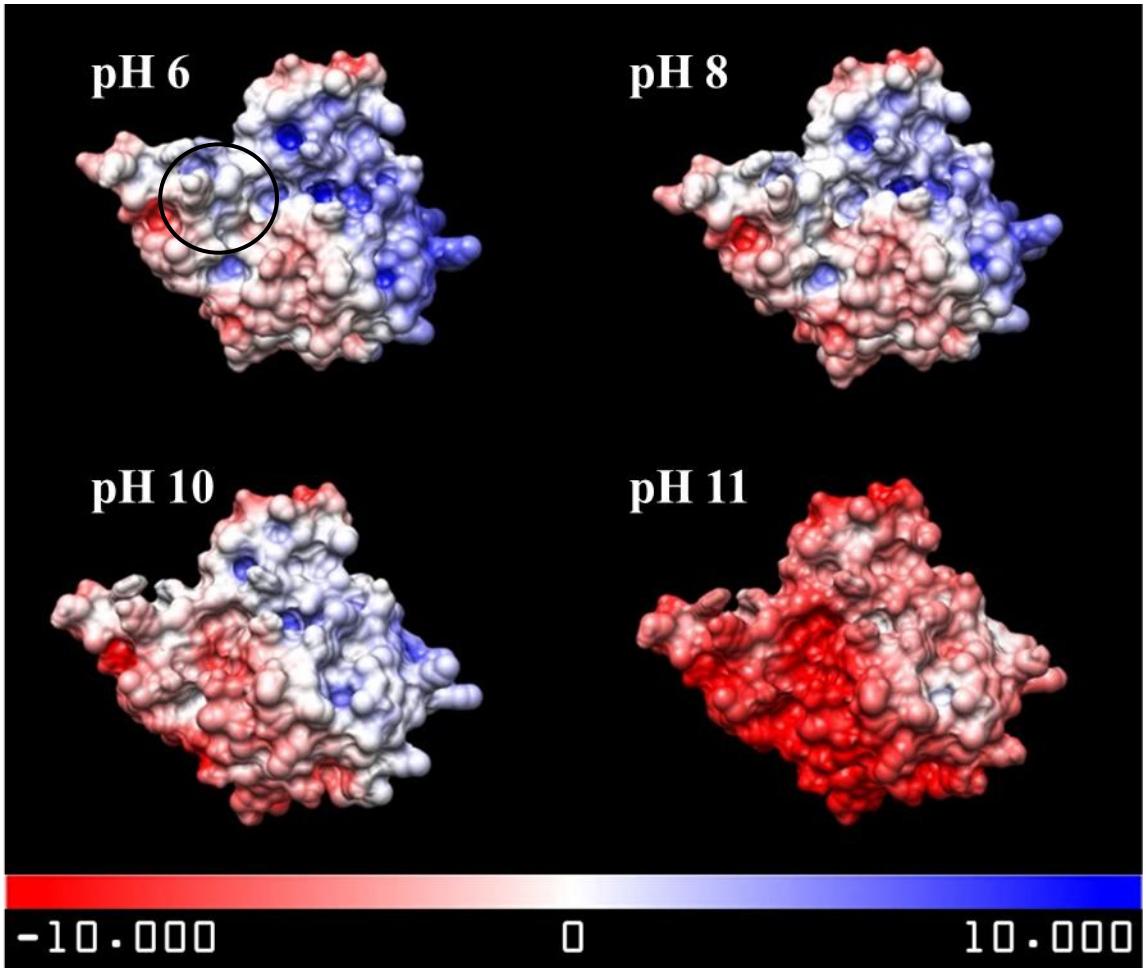


Figura 27. Mapas de potencial electrostáticos presentados en la superficie la estructura de LvFSH (el círculo negro señala la cavidad del sitio activo) a diferentes valores de pH: 6, 8, 10, 11. En la parte inferior se muestra la escala de potenciales utilizada de -10 a 10 K_BT/e_c.

Es posible observar que en pHs ácidos se mantiene un potencial positivo en la cavidad del sitio activo lo que dificulta la interacción de la enzima con el sustrato, mientras que a valores de pH básicos aumenta el potencial negativo lo que favorece dicha interacción. Esto ya ha sido reportado para otras lipasas y esterasas, y se observó una relación entre este fenómeno y el pH óptimo de catálisis de las enzimas determinado experimentalmente. Petersen *et al*. (2001) observaron que las lipasas presentan un potencial eléctrico positivo en la vecindad del sitio activo cuando se establecen condiciones de pH ácidas (pH 4) y se torna negativo conforme el pH se vuelve básico (pH 10). En el caso de LvFSH se observa que a pH 6 hay presencia de tanto cargas positivas como negativas casi de manera equitativa ya que el pH está cerca de su punto isoeléctrico (pH 6.45), y conforme se aumenta el pH las cargas negativas que rodean el sitio activo van aumentando de igual manera,

viendo un cambio significativo a pH 11, mostrando el comportamiento típico de las cargas superficiales en las lipasas. En el mismo estudio de Petersen *et al*., 2001, se observó que el pH óptimo reportado de las enzimas analizadas concordaba con el pH donde había fuerte presencia de cargas superficiales negativas en el sitio activo y sus alrededores, se necesitarían pruebas experimentales para saber si este comportamiento está también presente en LvFSH.

6.8.4 Acoplamiento Molecular (*Docking*)

Como se mencionó con anterioridad, las interacciones entre la proteína y su sustrato son una parte esencial de la catálisis, por lo que se hicieron ensayos computacionales de acoplamiento para observar esta interacción entre enzima y sustrato, utilizando el servidor SwissDock. Los resultados de SwissDock se analizaron y seleccionados con UCSF Chimera. Los experimentos con las condiciones mencionadas con anterioridad produjeron un gran número de resultados, de los cuales se seleccionaron aquellos modelos que mostraban una correcta posición y orientación del ligando dentro de la cavidad del sitio activo, además de presentar valores negativos de FullFitness y ΔG, especialmente este último nos indica que la interacción simulada se da de manera espontánea cuando el valor es negativo (cuadro 4). Se muestra en la figura 28 los acoplamientos de cuatro sustratos: *p*-NPA (C2), *p*-NPB (C4), *p*-NPL (C12), *p*-NPP (C16), dentro de la cavidad del sitio activo de LvFSH.

Cuadro 4. Valores estadísticos de los modelos resultantes del acoplamiento con cada sustrato.

Sustrato	**FullFitness (kcal/mol)**	**ΔG(kcal/mol)**
p-NPA (C2)	-1496.3081	-5.704
p-NPB (C4)	-1487.517	-5.67
p-NPL (C12)	-1496.138	-6.643
p-NPP (C16)	-1510.8514	-7.214

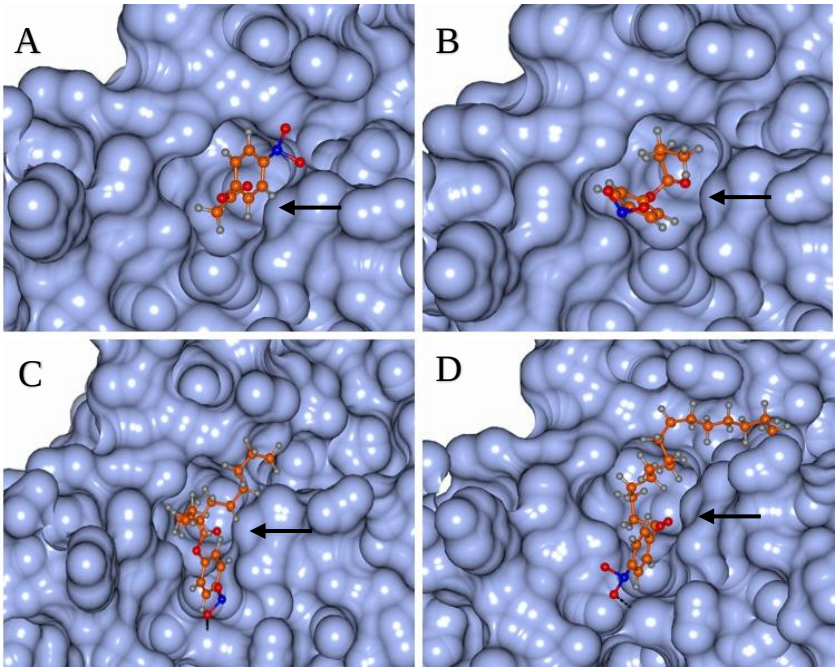


Figura 28. Acoplamiento LvFSH contra 4 sustratos *p*-nitrofenil ésteres: (A) *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA); (B) *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB); (C) *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL), (D) *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP). Flecha negra señala la posición del residuo (Ser) catalítico.

Algo que es apreciable en la figura 28 es el acomodo del sustrato dentro del sitio activo. Cuando se trata de un sustrato de cadena muy corta es difícil que este se oriente de manera correcta dentro del sitio activo, lo que provoca que se reduzca la afinidad de la enzima por el mismo, sin embargo conforme el tamaño del sustrato aumenta este se acomoda mejor dentro del mismo. Los sustratos de cadena larga (*p*-NPL y *p*-NPP), presentan un acomodo similar, en la parte más interna de la cavidad se encuentra el grupo carbonilo que será blanco del ataque nucleofílico para dar inicio a la catálisis; hacia la parte lateral se extiende la cadena alifática del ácido graso, y hacia afuera se posiciona el *p*-nitrofenol, que será liberado como producto de la hidrólisis. Los sustratos *p*-NPA y *p*-NPB comparten el acomodo del grupo carbonilo con el resto de los sustratos, sin embargo, las cadenas alifáticas no parecen presentar una disposición ordenada, posiblemente debido a su pequeño tamaño que permite que haya más interacciones inespecíficas dentro de la cavidad. Como anteriormente se mencionó la actividad enzimática de LvFSH contra uno de los sustratos utilizados ya ha sido reportada (García-Orozco *et al*., 2019), donde se observó que esta enzima mostraba una mayor afinidad por ésteres insolubles de cadena larga.

6.8.5 Comparación Estructural

Con el fin de observar similitudes de importancia biológica de la proteína de estudio contra otras previamente reportadas se realizó una comparación estructural utilizando el servidor en línea DALI (Holm, 2020). Las proteínas con la mayor similitud son enzimas hidrolasas, FSH1 de *Saccharomyces cerevisiae* (1YCD, Z-score 23.7, RMSD 1.8 (Quevillon-Cheurel *et al*., 2005)), Acil-proteína tioesterasa 2 de *Zea mays* (6AVY, Z-score 15.3, RMSD 2.8 (Burger *et al*., 2017)), y PE8 de *Pelagibacterium halotolerans* (5DWD, Z-score 15.2, RMSD 2.5 (Huo *et al*., 2017)). La superposición de las estructuras (figura 29) muestra que el núcleo central α/β hidrolasa compuesto por hebras-β y rodeado por hélices-α es altamente similar entre ellas (RMSD 1.1 – 1.3), no siendo así para la región tapadera donde se observa una mayor variabilidad. Esta conservación del núcleo central ya ha sido observada con anterioridad entre otros miembros de la familia α/β hidrolasa (Heikinheimo *et al*., 1999), esto es debido a que las proteínas de la familia α/β hidrolasa provienen de un ancestro común, manteniendo una alta conservación estructural, sobre todo en los lazos que contienen a la tríada catalítica (Ollis *et al*., 1992, Holmquist, 2000).

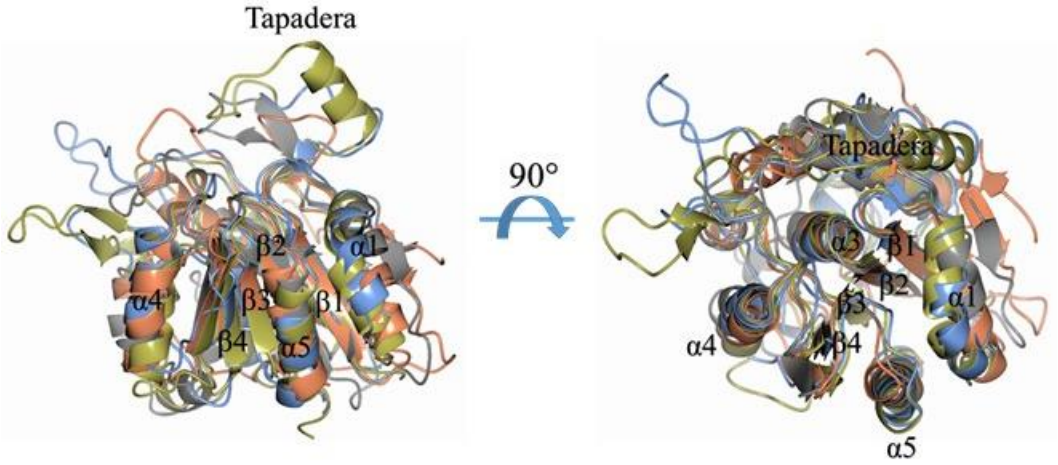


Figura 29. Superposición estructural de LvFSH de *L. vannamei* (azul); FSH1 de *S. cerevisiae*, PDB: 1YCD (dorado); PE8 de *P. halotolerans*, PDB: 5DWD (coral); Acil-proteína tioesterasa 2 de *Z. mays*, PDB: 6AVY (gris).

Como se puede observar en la figura 30 existe una alta variabilidad en la estructura tapadera de las diferentes enzimas. Tanto FSH1 como acil-proteína tioesterasa 2 muestran una tapadera de mayor tamaño en comparación con LvFSH, mientras que la tapadera de PE8 presenta un menor tamaño. FSH1 posee una hélice-α dentro de esta estructura, acil-proteína proteína tioestarasa 2 presenta dos hebras-β, y PE 8 no presenta estructuras secundarias.

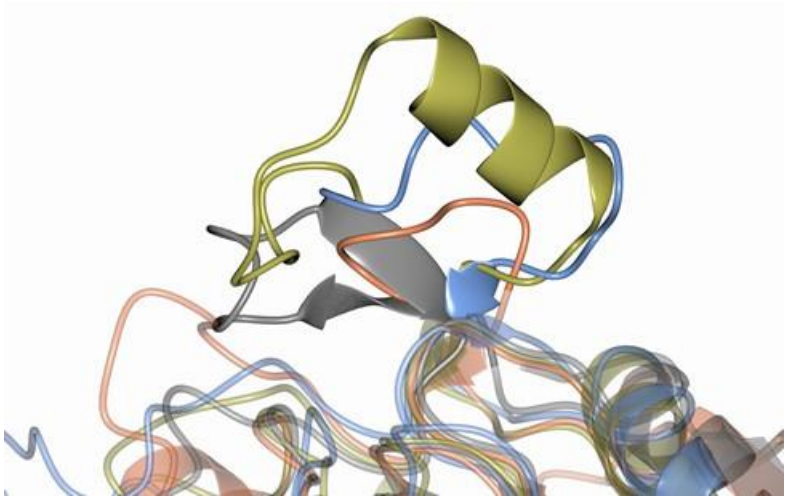


Figura 30. Superposición estructural de los dominios tapadera de las enzimas LvFSH de *L. vannamei* (azul); FSH1 de *S. cerevisiae*, PDB: 1YCD (dorado), PE8 de *P. halotolerans*, PDB: 5DWD (coral); acil-proteína tioesterasa 2 de *Z. mays*, PDB: 6AVY (gris).

Se ha discutido anteriormente como el dominio tapadera está relacionado con la especificidad de una lipasa por un sustrato. La proteína con la estructura más compleja en su tapadera es FSH1, sin embargo el papel que juega este dominio en la actividad o especificidad no ha sido reportado. Para el caso de acil-proteína tioesterasa 2 se ha observado que la tapadera juega un papel fundamental en la eficiencia catalítica de la enzima, al formar un túnel que funciona como ancla hidrofóbica que permite la unión con el sustrato, y estudiando su afinidad con *p*-nitrofenil ésteres se observó que posee una afinidad mayor por el *p*-NPP (Burger *et al*., 2017). PE8, posee un dominio tapadera compuesto por un simple lazo que no cubre el sitio activo, esta enzima mostró una mayor actividad contra *p*-NPA al realizar ensayos enzimáticos con p-nitrofenil ésteres (Huo *et al*., 2017). De estas enzimas PE8 posee el dominio tapadera más similar a LvFSH, consistiendo en un lazo sin estructuras secundarias, sin embargo al ser pE8 una esterasa, poseen distintas actividades

enzimáticas.

En todas las enzimas homólogas está presente la tríada catalítica conservada de las α/β hidrolasas (Ser, Asp, His). Además en PE8 y FSH1 la Ser catalítica se encuentra en el mismo codo nucleofílico que LvFSH (G-F-S-Q-G). Como se mencionó anteriormente, el agujero oxianión de LvFSH está compuesto por los aminoácidos Tyr y Gln, tal es el caso de PE8 (Tyr29 y Gln119), no siendo igual para FSH1 (Phe14 y Gln111) y acil-proteína tioesterasa 2 (Leu41 y Met127) (figura 31). Como se explicó con anterioridad las α/β hidrolasas tienen una alta conservación de sus principales características estructurales, especialmente en aquellos dominios necesarios para la catálisis, como se observa en la figura 32 la posición de los aminoácidos catalíticos y los aminoácidos del agujero oxianión están altamente conservados en estas enzimas.

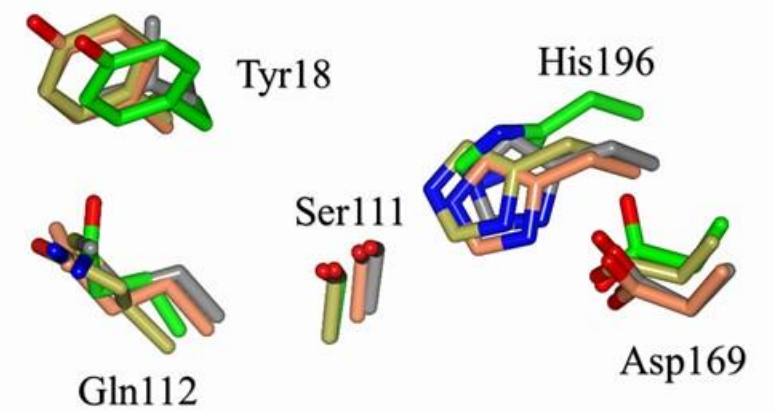


Figura 31. Superposición estructural de la tríada catalítica y el agujero oxianión de LvFSH de *L. vannamei* (verde), FSH1 de *S. cerevisiae* (dorado), PE8 de *P. halotolerans* (coral), acil-proteína tioesterasa 2 de *Z. mays* (gris).

La proteína PE8 de *Pelagibacterium halotolerans* es una esterasa de la familia LPCE (Lysophospholipase_Carboxyl Esterase) que se ha observado presenta alta similitud con lisofosfolipasas de esta familia (Wei *et al*., 2013). FSH1, es una enzima de *S. cerevisiae* perteneciente a la familia de serin hidrolasas (FSH) y ha sido caracterizada como una lisofosfolipasa encargada de hidrolizar lisofosfatidilserina (LPS) (Ramachandran *et al*., 2020), además se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína induce la apoptosis en *S. cerevisiae* (Gowsala *et al*., 2017). Dadas las similitudes estructurales observadas es posible que LvFSH posea actividad lisofosfolipasa. Como se mencionó previamente esta proteína no tiene relevancia

digestiva, y se ha propuesto que cumple una función energética y de movilización de lípidos (García *et al*., 2019). Las lisofosfolipasas son enzimas que hidrolizan lisofosfolípidos, y ayudan a mantener la homeostasis energética de la célula (Wepy *et al*., 2019). En el camarón esto significa que LvFSH podría participar en la producción de energía a partir de lisofosfolípidos en casos de requerimiento energético.

7. CONCLUSIÓN

Con el fin de profundizar en las características estructurales y enzimáticas, se sobreexpresó, purificó y cristalizó la proteína LvFSH de *L. vannamei*. Se obtuvo la proteína purificada a homogeneidad utilizando cromatografía de afinidad a níquel, cromatografía por interacción hidrofóbica y cromatografía de exclusión por tamaño. La enzima purificada mostró actividad contra contra *p*-NPP (C16), lo que apoya la noción que esta enzima hidroliza preferentemente sustratos de cadena larga. Se obtuvieron cristales con las nuevas condiciones de cristalización probadas en este estudio. La estructura determinada experimentalmente muestra valores de R_{work} y R_{free} de 0.3140 y 0.4024, por lo que los defectos del cristal (gemelitud), la baja resolución de los datos (3Å) o la baja homología del templado en el RM (25%), contribuyeron al elevado valor de estos parámetros. La estructura presentó el plegado α/β hidrolasa, constando de un núcleo de 4 hebras-β rodeado de 5 hélices-α. La tríada catalítica está compuesta por los aminoácidos Ser111, Asp169 e His196. Las lipasas que contienen el dipéptido GX en su agujero oxianión, presentan una mayor afinidad por los sustratos de cadena media y larga, lo que concuerda con los los resultados de actividad enzimática, ya que la enzima presenta actividad contra los dos sustratos utilizados (*p*-NPL, C12; *p*-NPP, C16). Además, el dominio tapadera sugiere que puede presentar actividad mono o diacilglicerol hidrolasa. Los resultados del acoplamiento muestran que se encuentra una mejor complementariedad entre el sitio activo y los sustratos insolubles de cadena larga (C12 y C16), sin embargo, es posible el acomodo de ésteres solubles de cadena corta de manera inespecífica (C2 y C4), esto puede ser un indicativo de la mayor afinidad que presenta esta enzima por sustratos de cadena larga. Las características estructurales de la enzima se asemejan a una lisofosfolipasa, se requeriría hacer pruebas para determinar si LvFSH posee dicha actividad. La preferencia por lípidos insolubles de cadena larga, y las características estructurales apoyan la noción de que esta enzima está involucrada en la hidrólisis y movilización de lípidos intracelulares, posiblemente en casos de requerimiento energético.

8. RECOMENDACIONES

- Se propone realizar experimentos de difracción de rayos X con los cristales obtenidos de las nuevas condiciones probadas en este estudio.

- Dadas limitaciones presentadas para resolver las fases por Reemplazo Molecular, se recomienda hacer pruebas de cristalización con metales pesados para usar el método de Dispersión Anómala.

- Se proponen hacer pruebas bioquímicas para evaluar la actividad monoacilglicerol hidrolasa, diacilglicerol hidrolasa y lisofosfolipasa.

- En este trabajo se resalta la importancia del metabolismo de lípidos en el camarón, lo que abre la puerta a que se profundice en el estudio de las proteínas involucradas en el mismo.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abergel C. 2013. Molecular replacement: tricks and treats. Acta Cryst. D. 69(1): 2167-2173.

Adams P. D., Afonine P. V., Bunkoczi G., Chen V. B., Davis I. W., Echols N., Headd J. J., Hung L. W., Kapral G. J., Grosse-Kunstleve R. W., McCoy A. J., Moriarty N. W:, Oeffner R., Read R. J., Richardoson J. S. Terwilliger T. C. y Zwart P. H. 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Cristallographr. D Biol. Crystallograph. 66(2): 213-221.

Ahmadian M., Duncan R. E., Jaworski K., Sarkadi-Nagy E., Sul H. S., 2007. Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. Future Lipidol. 2, 229–237.

Albayati S. H., Masomian M., Ishak S. N. H., Ali M. S. B. M., Thean A. L., Shariff F. B. M., Noor N. D. B. M., Raja Abd Rahman R. N. Z. 2020. Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity. Catalysts. 10(7): 747-781.

Anobom C. D., Pinheiro S., De-Andrade R., Aguieiras E., Andrade G. C., Moura M. V., Almeida R. V. y Freire D. M. 2014. From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. BioMed Research International. 54(1): 1-11.

Arrese E. L., Rajesh T. P., Soulages J. L. 2006. The Main Triglyceride-Lipase From the Insect Fat Body Is an Active Phospholipase A(1): Identification and Characterization. J. Lipid Res. 47(12): 2656-2667.

Bailey J. M. y Dunbar L. M. 1973. Essential fatty acid requirements of cells in tissue culture: a review. Exp. Mol. Pathol. 18: 142–161.

Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. 2013. Biochemistry. W. H. Freeman and Company. Séptima Edición. New York. 98 pp.

Borrelli G. M. y Trono D. 2015. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. Int. J. Mol. Sci. 16(1): 20774-20840.

Bornhorst J y Falke J. 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. Methods in Enzymology. 326(1): 245–254.

Brocca S., Secundo F., Ossola M., Alberghina L., Carrea G., Lotti M. 2003. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. Protein Sci. 12: 2312–2319.

Bun J. S., Slack M. D., Schemenauer D. E. y Johnson R. J. 2020. Comparative analysis of the human serine hydrolase OVCA2 to the model serine hydrolase homolog FSH1 from *S. cerevisiae*. PLoS ONE. 15(3): 1-10.

Bunaciu A. A., Udristiou E. A. y Aboul-Enein H. Y. 2015. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. Cri. Rev. Anal. Chem. 45(1): 289-299.

Burger M., Willige B. C., Chory J. 2017. A hydrophobic anchor mechanism defines a deacetylase family that suppresses host response against YopJ effectors. Nature Communications. 8: 2201-2201.

Cambillau C., Longhi S., Nicolas A., Martinez C. 1996. Acyl glycerol hydrolases: inhibitors, interface and catalysis. Curr. Opin. Struct. Biol. 6: 449–455.

Casas-Godoy L., Gasteazoro F., Duquesne S., Bordes F., Marty A. y Sandoval G. 2018. Lipases: An Overview. Methods in Molecular Biology. 1835(1): 3-38.

Carrazcosa F., Zaric S. y Silaghi-Dumitrescu R. 2014. Computational study of protein secondary structure elements: Ramachandran plots revisited. J. Mol. Graph. Model. 50(1): 125-133.

Cervillione F., McGurk C., Berger-Eriksen T., Van den Broeck W. 2017. Effect of starvation and refeeding on the hepatopancreas of whiteleg shrimp Penaeus vannamei (Boone) using computer-assisted image analysis. Journal of Fish Diseases. 40(11): 1707–1715.

Chayen N. y Saridakis E. 2008. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. Nature Methods 5(1): 147-153.

Chen Y. Y., Chen J. C., Tseng K. C., Lin Y. C., Huang C. L. 2015. Activation of immunity, immune response, antioxidant ability, and resistance against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* decrease under long-term culture at low pH. Fish Shellfish Immunol. 46: 192-199.

Cowtan K. 2003. Phase Problem in X-ray Crystallography, and Its Solution. In: Encyclopedia of life sciences. 10(1): 1-5.

del Monte A., Nolasco H., Forrellat A., Aragón C., García A., Díaz J., Carrillo O. 2002. Evidencias de la presencia de lipasas en el hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti*. AquaTIC. 16: 207-222.

Dias B., Machado de Castro A. y Zarur M. A. 2011. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. Enzyme Research. 2(1): 1-16.

Digel M., Ehehalt R., Füllekrug J. 2010. Lipid droplets lighting up: Insights from live microscopy. FEBS Letters. 584(11): 2168-2175.

Dugi K. A., Dichek H. L., Santamarina-Fojo S. 1995. Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. J. Biol. Chem. 270: 25396–25401.

Emsley P., Lohkhamp B., Scott W. G. y Cowtan K. 2010. Features and development of COOT. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66(4): 486-501.

Evans P. y Murshudov G. 2013. How good are my data and what is the resolution? Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 69(7): 1204–1214.

Fojan P. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. Biochimie. 82(11): 1033–1041.

Forrellat-Barrios A., Del Monte A., Estevez T., Bobur B., Nolasco H., Carrillo-Farnes O. 2004. Caracterización de lipasas en tres especies de camarones peneidos. Su importancia en la digestión. Memorias del Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA. Zaragoza, España.

Galindo C., Gaxiola G., Cuzon G., Chiappa-Carrara X. 2009. Physiological and Biochemical Variations During the Molt Cycle in Juvenile Litopenaeus Vannamei under Laboratory Conditions. Journal of Crustacean Biology. 29(4): 544-549.

García-Orozco K. D., Cinco-Moroyoqui F., Angulo-Sánchez L. T., Marquez-Rios E., Burgos-Hernandez A., Cardenas-Lopez J. L., Gomez-Aguilar C., Corona-Martinez D. O., Saab-Rincon G. y Sotelo-Mundo R. R. 2019. Biochemical Characterization of a Novel α/β-Hydrolase/FSH from the White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Biomolecules. 9(11): 674-693.

Ghaffari N., Sanchez-Flores A., Doan R., Garcia-Orozco K. D., Chen P. L., Ochoa-Leyva A., Lopez-Zavala A. A., Carrasco J. S., Hong C., Brieba L. G., Rudiño-Piñera E., Blood P. D., Sawyer J. E., Johnson C. D., Dindot S. V., Sotelo-Mundo R. R., Criscitiello M. F. 2014. Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. Sci. Rep. 25(4): 7081-7091.

Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. 2011. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. Nucleic Acids Res. 39: 270-277.

Gowsala R., Ravi C., Arul M., Nachiappan V. 2019. FSH1 overexpression triggers apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie Van Leeuwenhoek. 112(12):1775-1784.

Guerrand D. 2017. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. OCL. 24(4): 40-43.

Gupta R., Kumari A., Syal P., Singh Y. 2015. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. Prog. Lipid Res. 57: 40–54.

Hagel L. 2011. Gel filtration: size exclusion chromatography. Methods Biochem. Anal. 54(1): 51-91.

Haydn J. M. 2016. Exploring unconventional approaches to Molecular Replacement in Protein Crystallography with AMPLE. (Tesis de Doctorado). University of Liverpool. Liverpool, Inglaterra.

Heikinheimo P., Goldman A., Jeffries C. 1999. Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. Structure. 7(6): 141–146.

Holm L. 2020. DALI and the persistence of protein shape. Protein Science. (29): 128-140.

Holmquist, M. 2000. Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms. Current Protein and Peptide Science. 1(2): 209–235.

Huo Y.-Y., Li S., Huang J., Rong Z., Wang Z., Li Z., Ji R., Kuang S., Cui H.-L., Li J., Xu X.-W. (2017). Crystal structure of *Pelagibacterium halotolerans* PE8: New insight into its substrate-binding pattern. Scientific Reports. 7(1): 4422.

Ilari A. y Savino C. 2017. A Practical Approach to Protein Crystallography. Bioinformatics Volume I: Data, Sequence Analysis, and Evolution. Methods Mol. Biol. 1525(1): 47-78.

Jancarik J. y Kim S. H. 1991. Sparse Matrix Sampling: a screening method for crystallization of proteins. J Appl. Cryst. 24(1): 409-411.

Jensen R. G., DeJong F. A., Clark R. M. 1983. Determination of lipase specificity. Lipids. 18(3): 239–252.

Khan F. I., Lan D., Durrani R., Huan W., Zhao Z., Wang Y. 2017. The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. Front. Bioeng. Biotechnol.

5(16): 1-13.

Kelley L. A., Mezullis S., Yates C. M., Wass M. N. y Sternberg M. J. E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction and analysis. Nat. Protoc. 10(6): 845-858.

Kleywegt G. J. y Jones T. A. 1996. Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited. Structure. 4(12): 1395-1400.

Krauss I., Merlino A., Vergara A. y Sica F. 2013. An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. Int. J. Mol. Sci. 14(1): 11643-11691.

Koruza K., Bénédicte L., Nyblom M., Wolfgang K. y Zoë F. 2018. From Initial Hit to Crystal Optimization with Microseeding of Human Carbonic Anhydrase IX—A Case Study for Neutron Protein Crystallography. Crystals. 8(1): 434-444.

LaemmLi U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227(1): 680-685.

Laskowski R. A., MacArthur M. W. y Thornton J. M. 1998. Validation of protein models derived from experiment. Current Opinion in Structural Biology. 8(5): 631–639.

Lebedev A. A., Vagin A. A., Murshudov G. N. 2006. Intensity statistics in twinned crystals with examples from the PDB. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 62: 83–95.

Lee L. C., Lee Y. L., Leu R. J., Shaw J. F. 2006. Functional role of catalytic triad and oxyanion hole-forming residues on enzyme activity of *Escherichia coli* thioesterase I/protease I/ phospholipase L1. Biochem. J. 397: 69-76.

López-Mañanes A. A., del Valle J. C., Michiels M. S. 2015. Lipase activity sensitive to dopamine, glucagon and cyclic AMP in the hepatopancreas of the euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae). Crustaceana 88(1): 51-65.

Mandrich L., Menchise V., Alterio V., De Simone G., Pedone C., Rossi M., Manco G. 2007. Functional and structural features of the oxyanion hole in a thermophilic esterase from Alicyclobacillus acidocaldarius. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 71(4): 1721–1731.

Marchot P. y Chatonet A. 2012. Enzymatic Activity and Protein Interactions in Alpha/Beta Hydrolase Fold Proteins: Moonlighting Versus Promiscuity. Protein & Peptide Letters. 19(1): 132-143.

McCoy A. J., Grosse-Kunstleve R. W., Adams P. D., Winn M. D., Storoni L. C., Read R. J. 2007. *Phaser* crystallographic software. J. Appl. Cryst. 40: 658-674.

McPherson A. 1999. Crystallization of Biological Macromolecules. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2(1): 5-10.

McPherson A. y J. A. Gavira. (2014). Introduction to protein crystallization. Acta Cryst. F 70(1): 2–20.

Meyers A., Weiskittel T. M., y Dalhaimer P. 2017. Lipid Droplets: Formation to Breakdown. Lipids. 52(6): 465–475.

O'Boyle N. M., Banck M., James C. A., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. Journal of Cheminformatics. 3(1): 33-47.

Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken F. M., Harel M., Remington J., Silman I., Schrag J., Sussman J. L., Verscheuren K. H. G., Goldman A. 1992. The α/β hydrolase fold. Protein Engineering, Design and Selection. 5(3): 197-211.

Panizza P., Cesarini S., Diaz P., and Rodriguez-Giordano S. 2015. Saturation mutagenesis in selected amino acids to shift Pseudomonas sp. acidic lipase Lip I.3 substrate specificity and activity. Chem. Commun. 51: 1330–1333

Papiz M. Z. y Winter G. 2017. X-Ray Crystallography, Biomolecular Structure Determination Methods. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. 640–647.

Parsons S. (2003). Introduction to twinning. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. 59(11): 1995–2003.

Petersen M. T., Fojan P., Petersen S. B. 2001. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. Journal of Biotechnology, 85(2): 115–147.

Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S. Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. J. Comput. Chem. 25(13): 1605-1612.

Pihko P., Rapakko S., Wierenga R. K. 2009. Oxyanion Holes and Their Mimics. En: Phiko P. (ed.). Hydrogen Bonding in Organic Synthesis. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co, Weinheim, 43-71 pp.

Queiroz J. A., Tomaz C. T., y Cabral J. M. S. (2001). Hydrophobic interaction chromatography of proteins. Journal of Biotechnology. 87(2): 143–159.

Quevillon-Cheurel S., Leulliot N., Graille M., Hervouet N., Coste F., Bénédetti H., Zelwer C., Janin J., Van Tilbeurgh H. 2009. Crystal structure of yeast YHR049W/FSH1, a member of the serine hydrolase family. Protein Science. 14(5): 1350-1356.

Rajendran A., Vaidya K., Mendoza J., Bridwell-Rabb J. y Kamat S. S. 2020. Functional annotation of ABHD14B, an orphan serine hydrolase enzyme. Biochemistry. 59(2): 183-196.

Ramachandran G., Chidambaram R., Nachiappan V. 2020. FSH1 encodes lysophospholipase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters. 1-8.

Ranjbar M., Zibaee A., y Sendi J. J. 2014. Purification and characterization of a digestive lipase in the midgut of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Frontiers in Life Science. 8(1): 64–70.

Rivera-Pérez C. y García-Carreño F. 2011. Effect of fasting on digestive gland lipase transcripts expression in *Penaeus vannamei*. Marine Genomics 4(4): 273–278.

Rivera-Pérez C., Navarrete M. A., García-Carreño F. L. 2011. Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 158(1): 99-105.

Rivera-Pérez C., García-Carreño F. L. y Saborowski R. 2011b. Purification and Biochemical Characterization of Digestive Lipase in Whiteleg Shrimp. Marine Biotechnology. 13(2): 284-295.

Rossman M. G. y Blow D. M. 1962. The detection of sub-units within the crystallographic

asymmetric unit. Acta Cryst. 15(1): 24-31.

Rupp B. 2010. Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology. Garland Publishing. Primera edición. Nueva York. 12-20 pp.

Sánchez J. M. 2007. Biotecnología blanca e industria farmacéutica. An. R. Acad. Nac. Farm. 73(1): 501-535.

Santana, C., Barbosa, L., Júnior, I., Nascimento, T., Dornelas, C., & Grillo, L. (2017). Lipase Activity in the Larval Midgut of *Rhynchophorus palmarum*: Biochemical Characterization and the Effects of Reducing Agents. Insects. 8(3): 100-107.

Santarossa G., Lafranconi P. G., Alquati C., Degioia L., Alberghina L., Fantucci, P., Lotti M. 2005. Mutations in the "lid" region affect chain length specificity and thermostability of a *Pseudomonas fragi* lipase. FEBS Letters. 579: 2383–2386.

Sarmah N., Revathi D., Sheelu G., Yamuna K., Sridhar S., Mehtab V. y Sumana C. 2017. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. Biotechnol Progr. 34(1): 5–28.

Slim C., Ahmed F., Nabil M., Heykel T., Hafedh M., Youssef G. 2007. Crab digestive lipase acting at high temperature: purification and biochemical characterization. Biochimie. 89: 1012–1018.

Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. y Klenk D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150 (1): 1-3.

Song X., Qi X., Hao B., Qu Y. 2008. Studies of substrate specificities of lipases from different sources. European Journal of Lipid Science and Technology. 110(12): 1095–1101.

Sterling T. e Irwin J. 2015. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. J. Chem. Inf. Model. 55(11): 2324-2337.

Sun Y., Yin S., Feng Y., Li J., Zhou J., Liu C., Zhu G. y Guo Z. 2014. Molecular Basis of the General Base Catalysis of an α/β-Hydrolase Catalytic Triad. J. Biol. Chem. 289(22): 15867-15879.

Thompson M. C. 2017. Identifying and Overcoming Crystal Pathologies: Disorder and Twinning. Methods Mol. Biol. 1607: 185-217.

Tsurumura T. y Tsuge H. 2014. Substrate selectivity of bacterial monoacylglycerol lipase based on crystal structure. J. of Struct. Funct. Genomics. 15(3): 83–89.

Waseda Y., Matsubara E., Shinoda K. 2010. X-Ray Diffraction Crystallography, Introduction Examples and Solved Problems. Springer. Primera edición. Berlin. 54-65 pp.

Wei X., Jiang X., Ye L., Yuan S., Chen Z., Wu M., Yu H. 2013. Cloning, expression and characterization of a new enantioselective esterase from a marine bacterium *Pelagibacterium halotolerans* $B2^T$. Journal of Molecular Catalysis

Wepy J. A., Galligan J. J., Kingsley P. J., Xu S., Goodman M. C., Tallman K. A., Rouzer C. A., Marnett L. J. 2019. Lysophospholipases cooperate to mediate lipid homeostasis and lysophospholipid signaling. J. Lipid Res. 60(2): 360-374.

Wildmann M., Juhl P. B., Pleiss J. 2010. Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A. BMC Genomics. 11(1): 123-130.

Winn M. D., Ballard C. C., Cowtan K. D., Dodson E. J., Emsley P., Evans P. R., Keegan R. M., Krissinel E. B., Leslie A. G. W., McCoy A., McNicholas S. J., Murshudov G. N., Pannu N. S., Potterton E. A., Powell H. R., Read R. J., Vagin A., Wilson K. S. 2011 Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 67:235–242.

Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., Jaskolski, M. 2008. Protein crystallography for non-crystallographers or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. FEBS. 275(1): 1-21.

Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., Jaskolski, M. 2013. Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. FEBS. 280(22): 5705-5736.

Yang J., Koga Y., Nakano H., Yamane T. 2002. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through *in vitro* combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. Protein Engineering. 15(2): 147-152.

Yeates T. O. 1997. [22] Detecting and overcoming crystal twinning. Methods Enzymol. 276: 344-358.

Yeates T. O., Fam B. C. 1999. Protein crystals and their evil twins. Structure. 7(2): R25-R29.

Yen C. L., Nelson D. W., Yen M. I., 2015. Intestinal triacylglycerol synthesis in fat absorption and systemic energy metabolism. J. Lipid Res. 56: 489-501.

Yu X. W., Wang L. L., Xu Y. 2009. *Rhizopus chinensis* lipase: gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties. J. Mol. Catal. B Enzym. 57: 304–311.