

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

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y BIOFÍSICA  
DE LA LISOZIMA RECOMBINANTE DE *Manduca  
 sexta***

**Que presenta:**

**Alonso Alexis López Zavala**

Como requisito Parcial para obtener el grado de

**Maestría en ciencias**

aprobada por:

**Coordinación de Tecnología de Alimentos  
de Origen Animal**

Diciembre 2004, Hermosillo, Sonora

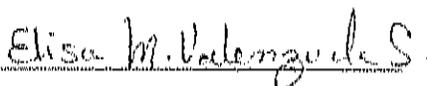
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Alonso Alexis López Zavala, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



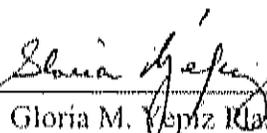
---

Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo  
Director de tesis



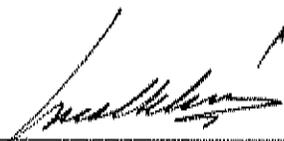
---

Dra. Elisa M. Valenzuela Soto



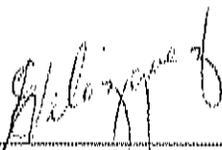
---

Dra. Gloria M. Vejmz Rascencia



---

Dra. Ana Ma. Calderón de la Barca



---

Dr. Enrique Velázquez Contreras

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido en este trabajo sin el permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de las tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)

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



---

Dr. Alfonso Gardea Béjar  
Director General

*Son tres palabras, tan simples que encierran un infinito que solo cabe en ellas;  
únicamente aquellos que la posean podrán sentirlas,  
por mi familia*

## AGRADECIMIENTOS

Doy las gracias al consejo nacional de ciencia y tecnología por la beca otorgada durante la duración de mis estudios de maestría. Mi reconocimiento al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C por permitirme incursionar en el mundo de la investigación. Así mismo, agradezco en el apoyo y las facilidades otorgadas al Departamento de Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora en el uso del equipo de difracción circular.

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Rogelio Sotelo Mundo por su excelente dirección de este trabajo de investigación. Así como por la confianza, guía, consejos y paciencia en mi aprendizaje científico y humano.

A mi comité de tesis, gracias por sus comentarios y sugerencias que indudablemente enriquecieron el contenido de este trabajo de investigación. Especialmente a la Dra. Elisa Valenzuela por su paciencia y ayuda en mis innumerables consultas.

A mis compañeros del laboratorio de biología de organismos acuáticos; su amistad, compañía y crítica son inigualables. Mi reconocimiento a M.C. Karina García, tus consejos y esos momentos de discusión constantes son indudablemente parte muy importante en mi formación académica. Gracias por tu amistad. Los regaños y remiendos créeme, no fueron en vano; gracias comadre.

A mis amigos que siempre estuvieron brindado su apoyo, compañía y solventando los momentos de dicha y aquellos otros en los que se nos vino el nubarrón encima. Muy en especial a los amigos que desde hace varios años hemos sido nuestro soporte en todo momento. A gaby, pienso cuantas palabras existirán para describir tu presencia.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Relación estructura-función de las proteínas.....	3
Tipos de estructuras en proteínas.....	3
Modelos de catálisis enzimática.....	6
El modelo estático, llave-cerradura.....	6
El modelo dinámico, ajuste inducido .....	6
Herramientas moleculares y biofísicas en estudios de estructuras proteicas.....	10
Sobreexpresión y replegamiento de proteínas recombinantes.....	10
Técnicas biofísicas para el estudio de estructuras de proteínas.....	14
Estructuras proteicas en solución: espectroscopía de dicroísmo circular.....	15
UV-lejano (240-180 nm).....	16
UV-cercano (320-260 nm).....	17
La lisozima como modelo para estudios de estructura-función en proteínas.....	20
Función y clasificación.....	20
Estructura y mecanismo catalítico.....	22
Lisozima en insectos.....	25
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
Objetivos específicos.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Reactivos.....	31
Sobreexpresión y replegamiento.....	31
Purificación de la enzima.....	32
Cromatografía de afinidad.....	32
Conjugación de <i>Micrococcus luteus</i> a la matriz de agarosa.....	32

Cromatografía de afinidad a <i>Micrococcus luteus</i> .....	33
Cromatografía de intercambio catiónico .....	34
Cuantificación de proteína y electroforesis.....	34
Ensayo de actividad enzimática con <i>Micrococcus luteus</i> .....	35
Temperatura y pH óptimo.....	35
Secuenciación del N-terminal.....	36
Análisis de estructura secundaria.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
Purificación de la enzima.....	38
Secuenciación del N-terminal.....	42
Dicroísmo circular y análisis de estructura secundaria.....	44
Actividad lítica en función de la temperatura y pH.....	49
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
REFERENCIAS.....	54
APENDICE .....	61
Artículo 1. Biophysical characterization of an insect lysozyme from <i>Manduca sexta</i>	
Artículo 2. Overexpression of Lysozyme rom <i>Manduca sexta</i> as Inclusion Bodies, Refolding and Purification by <i>Micrococcus uteus</i> Affinity Chromatography	

## FIGURAS

Figura 1. Niveles de organización estructural de las proteínas . . . . .	5
Figura 2. Esquemas representativos del modelo estático (Fischer) y dinámico (Koshland) . . . . .	8
Figura 3. Estructura tridimensional de dos SOD coordinando diferente ión. . . . .	9
Figura 4. Intercambio (reacomodo) de disulfuros durante el replegamiento; R, glutation reducido y oxidado o cistina y cisteína. . . . .	12
Figura 5. Estructuras de los diferentes estadios del replegamiento de Barnasa mediante NMR y dinámica molecular. . . . .	13
Figura 6. Espectros típicos de CD de los diferentes tipos de estructuras secundarias de proteínas. . . . .	17
Figura 7. Sitio de hidrólisis de la lisozima en el peptidoglicano bacteriano. . . . .	21
Figura 8. Mecanismo catalítico de HEWL. . . . .	24
Figura 9. Actividad enzimática de Bmlis y HEWL en función de la temperatura utilizando como sustrato <i>M. luteus</i> . . . . .	28
Figura 10. Cromatografía de afinidad de la lisozima recombinante de <i>M. sexta</i> . . . . .	39
Figura 11. Electroforesis reductora y desnaturalizante de la purificación de Mslis. . . . .	40
Figura 12. Cromatografía de Intercambio iónico de Mslis. . . . .	41
Figura 13. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de lisozima tipo <i>c</i> de varios insectos y HEWL. . . . .	42
Figura 14. Alineamiento múltiple del N-terminal de lisozimas tipo <i>c</i> de varios insectos y HEWL. . . . .	43
Figura 15. Espectro de CD de Mslis en el UV- lejano (178-260nm). . . . .	45
Figura 16. Puentes disulfuro en la HEWL. . . . .	46
Figura 17. Actividad enzimática de Mslis en fusión del pH a 37°C. . . . .	50
Figura 18. Temperatura óptima de Mslis y HEWL a pH 6.0. . . . .	51
Figura 19. Actividad relativa en función de la temperatura de Mslis y HEWL . . . . .	52

## RESUMEN

La lisozima (E.C. 3.2.1.17) es una glicohidrolasa que rompe los enlaces  $\beta$  (1-4) entre el ácido N-acetil murámico y la N-acetil glucosamina del peptidoglicano que se encuentra en la pared celular de las bacterias Gram (+). La lisozima ha sido ampliamente estudiada en vertebrados e invertebrados como modelo de estudio del plegamiento y de la relación estructura-función de las proteínas. Entre los factores de defensa de los insectos se encuentran la lisozima, la cual es una proteína inducible en respuesta a un estímulo externo. La mayoría de las lisozimas de insectos tienen características moleculares y catalíticas similares a la lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL, tipo c). Sin embargo, en los últimos años se han descubierto propiedades catalíticas novedosas en la lisozima de insectos que difieren de las tipo c. En un intento por elucidar la relación entre la estructura y función se han caracterizado algunas lisozimas de insectos y estudiado su relación con las tipo c. En el presente trabajo se inició la caracterización bioquímica y biofísica de la lisozima recombinante del insecto *Manduca sexta* (Mslis). La Mslis fue purificada mediante cromatografía de afinidad a *Micrococcus luteus* a partir de un extracto proveniente de sobreexpresión recombinante en *Escherichia coli* y plegamiento in vitro. En base a la secuencia deducida de aminoácidos y a la secuencia del N-terminal, la Mslis pertenece al tipo c. Entre las características bioquímicas de la Mslis recombinante se encontró que el pH óptimo fue 6.5, lo que concuerda con lo reportado para otras lisozimas tipo c utilizando *M. luteus* como sustrato. La temperatura óptima de Mslis (35°C) fue 10°C más baja que para HEWL (45°C) a pH 6.0. La actividad catalítica de la Mslis a bajas temperaturas (5-25°C) fue de 2-4 veces mayor que para HEWL. Este resultado es similar a lo reportado para la lisozima de *Bombix mori*, en la que se han encontrado características similares a las enzimas adaptadas al frío. Por otro lado, se determinó el contenido de estructura secundaria de Mslis mediante dicroísmo circular. El contenido de estructura secundaria de la Mslis mostró una tendencia similar a otras lisozimas, es decir, mayor contenido de hélices- $\alpha$ . Sin embargo, para Mslis éste porcentaje (hélices- $\alpha$  = 57%) es mayor que el de cualquier otra lisozima tipo c reportada a la fecha.

a la fecha, los estudios indican que la identidad a nivel de secuencia primaria altamente probablemente implica una similitud estructural. El presente trabajo muestra que la /vblis tiene características similares a las de otros insectos, por lo tanto, estas propiedades podrían ser particulares de las lisozimas de estos organismos. Por último, son necesarios más estudios estructurales y bioquímicos para entender si la estructura secundaria encontrada está relacionada con el comportamiento catalítico observado o de forma alternativa, determinar si se ha aislado un conformero funcional producto de repliegue incorrecto artificial de la proteína.

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas son biomoléculas que desempeñan funciones importantes en la célula. Estas moléculas poseen diversos tipos de conformaciones estructurales en su arquitectura molecular. Cada una de ellas, y en conjunto, están estrechamente relacionadas con la función molecular en su sistema biológico. Desde hace varias décadas se ha venido trabajando en desarrollar modelos y teorías para entender la relación entre la estructura y la función de una proteína. Por lo tanto, la conjugación de diversas ramas de la ciencia ha sido necesaria para generar conocimiento respecto a este importante evento molecular. La cristalografía de rayos X, acoplada con herramientas biofísicas como dicroísmo circular y la conexión con la caracterización de las propiedades catalíticas de las enzimas han sido de gran ayuda en esta labor.

La lisozima (EC. 3.2.1.17) es una glicohidrolasa que fue descubierta por Fleming en 1922 y es considerada como una enzima antibacteriana. Se define como una 1,4- $\beta$ -acetil muramidasa, ya que cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$  1-4 entre el C-1 del ácido N-acetil murámico y el C-4 de la N-acetil glucosamina (Jolles y Jolles, 1984). A la fecha se han identificado diversos tipos de lisozimas, siendo las de tipo *c* las más ampliamente estudiadas. El mecanismo de catálisis de esta enzima fue descrito a partir de las observaciones cristalográficas de su estructura tridimensional (Phillips, 1966; Blake *et al.*, 1967). A partir de estos estudios, se hizo evidente que las moléculas biológicamente activas requieren de una estructura única y definida para llevar a cabo su función. Por lo anterior, la lisozima se ha tomado como modelo de estudio de la relación entre la estructura y función, así como de replegamiento *in vitro* de las proteínas.

Las secuencias, estructuras cristalográficas, estudios de la relación estructura-función e inmunológicos se han analizado ampliamente en lisozimas de vertebrados. Específicamente, la lisozima de clara de huevo de gallina (HEWL) ha sido la más estudiada; sin embargo, también se ha identificado la presencia de lisozima en muchos

invertebrados incluidos los insectos. Estos organismos carecen de inmunoglobulinas, pero se ha detectado la presencia de péptidos y proteínas antibacterianas involucradas en resolver la infección (Gillespie *et al.*, 1997). En estudios realizados por Jolles *et al* (1979) en tres insectos, se encontró que la lisozima participa en su sistema de defensa. Se han publicado varios trabajos sobre la secuencia de la proteína, el cDNA, así como la inducción de la expresión del gen de lisozima en insectos y se sabe que pertenece al tipo c. Sin embargo, son pocos los estudios que han tratado de relacionar la estructura y la función de esta enzima.

En la actualidad se conocen solo dos estructuras tridimensionales de lisozima de insectos, la de *Antheraea myllita* (PDB: 1H1Z) y la de *Bombyx mori* (PDB: 1GD6). Aún cuando tienen una arquitectura estructural similar a HEWL, presentan características catalíticas y estructurales distintas a HEWL (Masaki *et al.*, 2001; Matsuura *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). El objetivo de este estudio fue estudiar bioquímica y biofísicamente a la lisozima recombinante del insecto *Manduca sexta*. Esto con la finalidad de investigar si existen propiedades funcionales particulares de la lisozima de este tipo de organismos. Así mismo, sentar las bases para futuros estudios estructurales y cinéticos que permitirán un mejor entendimiento de las propiedades de esta enzima.

## ANTECEDENTES

### Relación Estructura-Función de las Proteínas

En 1936 Alfred Mirsky y Linus Pauling hicieron una descripción, considerada moderna para su época, de una proteína nativa. "...consiste de una cadena polipeptídica sin interrupción alguna a través de ella (en ciertos casos, de dos o mas polipéptidos); esta cadena está plegada en una conformación única definida, la cual se mantiene (principalmente) por puentes de hidrógeno entre átomos de nitrógeno y oxígeno peptídicos y también entre el amino y el carboxilo libres de los residuos de aminoácidos". Así mismo, describen a una proteína desnaturalizada como "aquella que se caracteriza por la ausencia de una conformación única definida" (Mirsky y Pauling, 1936). A partir de estas observaciones, necesariamente una proteína con alguna función biológica o catalítica debe tener una estructura espacialmente definida y conservada.

### **Tipos de Estructuras en Proteínas**

La función de una proteína está estrechamente ligada a su conformación espacial. Debido a la importancia estructural de las proteínas, se ha creado una clasificación de los diversos arreglos espaciales que puede tomar una proteína. Los primeros trabajos sobre estructura de proteínas y aminoácidos fueron realizados en la década de los 50's con el descubrimiento de la hélice- $\alpha$  y las hojas- $\beta$  por Linus Pauling (Pauling y Corey, 1951; Pauling y Corey, 1951; Pauling y Corey, 1951; Pauling *et al.*, 1951). Así mismo, Linderstrom-Lang fue el primero que introdujo el término de estructura secundaria, basado en las observaciones realizadas por Pauling (Dill, 1990). Con la determinación de la estructura tridimensional de la lisozima de clara de huevo por el grupo de David Phillips en 1965, fue posible establecer las primeras observaciones directas acerca de la estructura de una proteína. Tales observaciones fueron muy importantes y sirvieron como

base para iniciar los estudios detallados acerca del mecanismo catalítico de las enzimas. En la actualidad, con los avances tecnológicos y el desarrollo e implementación de técnicas biofísicas y estructurales, ha sido posible caracterizar los tipos de estructuras y fuerzas partícipes en dichas arquitecturas proteicas (Dill, 1990).

Las proteínas están compuestas por cuatro tipos de estructuras. *La primaria*, consiste en la composición y el orden lineal de los aminoácidos que forman la proteína. Esta secuencia lineal es sintetizada en dirección del amino terminal hacia el carboxilo terminal de la cadena. Existen varios tipos de *estructura secundaria*, como son hélices- $\alpha$ ,  $\beta$ -plegados, lazos o vueltas y estructuras desordenadas. Cada una de estas estructuras depende de la posición que tomen los aminoácidos en el espacio y en conjunto conforman lo que se denomina estructura secundaria. Las hélices- $\alpha$  y hojas- $\beta$  son estructuras que se estabilizan por puentes de hidrógeno. Estas interacciones ocurren entre los protones del grupo amida y los oxígenos del grupo carbonilo de los aminoácidos que componen a la proteína. Por ejemplo, cada enlace de hidrógeno de la hélice- $\alpha$  se forma entre el oxígeno del carbonilo y el protón de grupo amida del cuarto residuo mas adelante en la hélice (Mathews, 2000). Pauling dedujo que cada 3.6 residuos de aminoácido la hélice- $\alpha$  da una vuelta y esta se repite cada 18 residuos (Pauling *et al.*, 1951). La *estructura terciaria* es el arreglo en tres dimensiones o espacial de la proteína sobre sí misma (el plegamiento de la estructura secundaria). La mayoría de las proteínas contienen los tres primeros tipos de estructuras, sin embargo, existe un cuarto tipo de estructura proteica conocida como *estructura cuaternaria*. Esta se forma cuando la proteína está compuesta por más de una cadena polipeptídica (Mathews, 2000). En la figura 1 se observan los diversos tipos de estructuras que conforman una proteína.

Cabe mencionar que existe una dependencia directa entre los diversos tipos de estructuras de una proteína y su función. La estructura primaria es la que determina cual será el acomodo espacial de la proteína, y a la vez esta última determina la funcionalidad de la molécula (en el caso de proteínas monoméricas). Por lo tanto, si no existe un plegamiento

correcto de la proteína, es muy probable que no desempeñe adecuadamente su función. Christian D. Anfinsen en 1954 propuso que la secuencia de aminoácidos determina directamente la estructura terciaria de una proteína (Anfinsen *et al.*, 1954). Es decir, a una secuencia aminoacídica corresponde a una y solo una estructura tridimensional para una proteína dada. Los priones son una excepción notable al dogma de Anfinsen, estas son proteínas que tiene la capacidad de tomar conformaciones espaciales estables y completamente diferentes a partir de la misma secuencia de aminoácidos (Nunziante *et al.*, 2003). En la actualidad no existe un postulado en el que se explique cual es el mecanismo por el que las proteínas (o bien las enzimas) toman su conformación activa. En el desarrollo de los antecedentes de este trabajo se abordarán algunas de las teorías y principios básicos acerca del plegamiento de proteínas y sus implicaciones en la funcionalidad de estas moléculas.

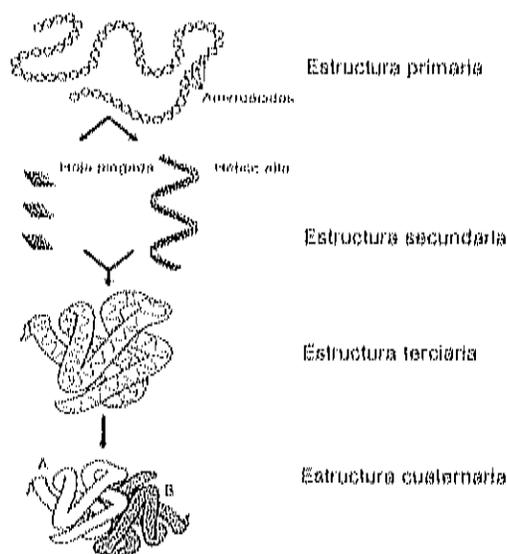


Figura 1. Niveles de organización estructural de las proteínas. A y B significan cadenas polipeptídicas independientes (Tomada de <http://es.wikipedia.org/wiki/Imagen:Proteina.jpg>).

### **Modelos de Catálisis Enzimática**

La catálisis enzimática requiere de la unión específica de uno o más moléculas de sustrato al sitio catalítico y de las interacciones con esa cavidad. Tales interacciones promueven la disminución de la energía de activación de la reacción que se cataliza para generar uno o mas productos (Jencks, 1987). Es decir, una enzima es un catalizador, potenciador, facilitador de una reacción química -sin modificar el equilibrio de la reacción- bajo condiciones fisiológicas de pH ( $\approx 7.0$ ) y temperatura ( $\approx 37^\circ\text{C}$ ) mediado por la interacción del complejo enzima-sustrato-producto. La disminución de la energía de activación, conduce a un estado de transición que favorece la conversión del (los) sustrato(s) a producto(s) (Mathews, 2000). Por lo tanto, se han propuestos varios modelos para explicar como ocurren las reacciones catalizadas por las enzimas y así tratar de entender su importancia dentro de los procesos metabólicos.

El modelo estático, llave-cerradura (E. Fischer, 1894). Este modelo propone que el sitio activo de la enzima tiene una estructura rígida y exactamente complementaria a la estructura del sustrato, lo que facilita su unión y la catálisis. O bien, este proceso depende de la estereoquímica de las moléculas, es decir, de la posición relativa entre los átomos que participan en la reacción. El mecanismo se puede entender considerando a la enzima como una cerradura y al sustrato como su llave (Figura 2). Este modelo explica el alto grado de especificidad de una enzima. Sin embargo, no permite entender el concepto actual de catálisis, ya que la cerradura no modifica la conformación de la llave.

El modelo dinámico, ajuste inducido (D. Koshland, 1958). El modelo de ajuste inducido es una modificación del modelo propuesto por Fischer. Koshland propone que el sitio activo de la enzima no es exactamente complementario a la forma del sustrato. Más bien, la presencia del sustrato causa una modificación estructural del sitio activo de la enzima para facilitar la unión del sustrato. Además, no solo la enzima se modifica, si no que el

sustrato también se ajusta la cavidad catalítica. Estas modificaciones favorecen la formación de un intermediario de alta energía muy cercano al estado de transición, el cual es favorable para que se lleve a cabo la reacción enzimática. En otras palabras, es un modelo "dinámico", llamado así por las modificaciones conformacionales tanto de la enzima como del sustrato durante la catálisis.

Como ejemplo del modelo de Koshland podemos mencionar a la dihidrofolato reductasa (DHFR), enzima para la cual se han caracterizado en detalle los movimientos estructurales que ocurren durante la catálisis. Esta enzima cataliza la reducción del 7,8-dihidrofolato a 5,6,7,8- tetrahidrofolato (THF) utilizando NADPH como coenzima. El THF es un precursor esencial para la síntesis de timidilato y de varios aminoácidos (Met y Gly) (Mathews, 2000). Esta enzima ha sido estudiada ampliamente con técnicas cinéticas, espectroscópicas y estructurales. Mediante cristalografía de rayos-X de la DHFR de *E. coli*, se ha logrado obtener la estructura de la enzima en diferentes estadios catalíticos con sus ligandos y cofactores. Sawaya y Kraut (1997), utilizaron esta información y encontraron que tanto la enzima como el sustrato, asumen diferentes movimientos conformacionales durante todo el proceso catalítico. Estos autores concluyen que tales movimientos son necesarios para que la enzima lleve a cabo la unión y catálisis de los sustratos (Sawaya y Kraut, 1997). Además, Tsuo (1998), en una extensa revisión sobre la flexibilidad del sitio activo de varias enzimas, señala que podría existir una conformación única para cada estadio del proceso catalítico de las enzimas (Tsou, 1998). Otras enzimas como la ribonucleasa A, quimotripsina, tirosina fosfatasa entre otras, son ejemplos específicos de múltiples intermediarios y modificaciones conformacionales durante la catálisis (Hammes, 2002).

No solo las modificaciones a nivel de sitio activo son importantes para la catálisis, sino que existen interacciones importantes con regiones cercanas a la vecindad de la cavidad catalítica. En la DHFR de *E.coli* una mutación (G121V) lejana al sitio activo causa

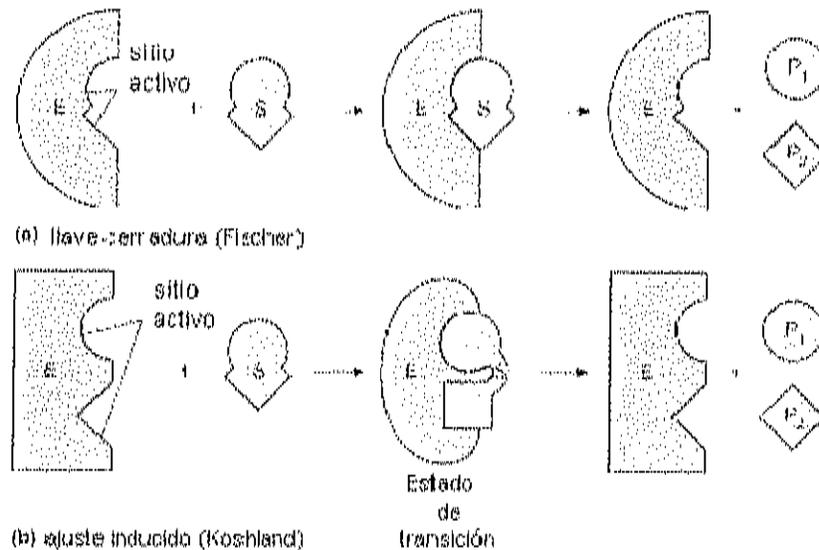


Figura 2. Esquemas representativos del modelo estático (Fischer) y dinámico (Koshland). Tomado de Mathews, (2000).

alteraciones en las propiedades conformacionales y por lo tanto, en su capacidad catalítica (Cameron y Benkovic, 1997). De acuerdo con la información existente, la catálisis mediada por una enzima requiere de modificaciones tanto en la estructura de la enzima como del sustrato. Sin embargo, aún no se ha encontrado una relación directa entre los movimientos estructurales de la proteína como un todo y la catálisis en sí. Es evidente que es necesario caracterizar tales modificaciones para poder generar modelos más exactos que permitan una mejor comprensión de lo que sucede durante la catálisis biológica.

De acuerdo a lo discutido anteriormente, un modelo estructural es intrínsecamente estático. Es decir, es la localización y el arreglo que toman los átomos que componen a una proteína en un espacio de tiempo definido. Por lo tanto, un modelo estructural por sí mismo no refleja la función de una molécula biológicamente activa.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es un ejemplo claro de la relación estructura-función. Existen diferentes tipos de SOD y se diferencian por su secuencia y el ión metálico que coordinan (Mg, Mn, Cu, Fe o Zn). Todas ellas protegen a la célula del daño oxidativo catalizando la degradación del ión superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno (Mathews, 2000). Sin embargo, no todas las enzimas pertenecientes a esta familia tienen el mismo arreglo espacial. La estructura de la SOD de manganeso está compuesta principalmente por hélices- $\alpha$  ( $>50\%$ ) y solo el 3.5 % de hojas- $\beta$  (Borgstahl *et al.*, 2000). Por otro lado, más del 36 % de la SOD de cobre-zinc son hojas- $\beta$  y el 3.3% de la estructura de la enzima corresponde a las hélices- $\alpha$  (Hough y Hasnain, 1999) (Figura 3). En base a esto, lo que hace que una proteína cumpla con su función no es únicamente su plegamiento *per se*. Es decir, la función de una proteína no está definida por su contenido y acomodo de hélices- $\alpha$  alfa y hojas- $\beta$  en su estructura. El arreglo y disposición de los residuos de los aminoácidos en la proteína como un todo y en un medio dado, es lo que determina su función.

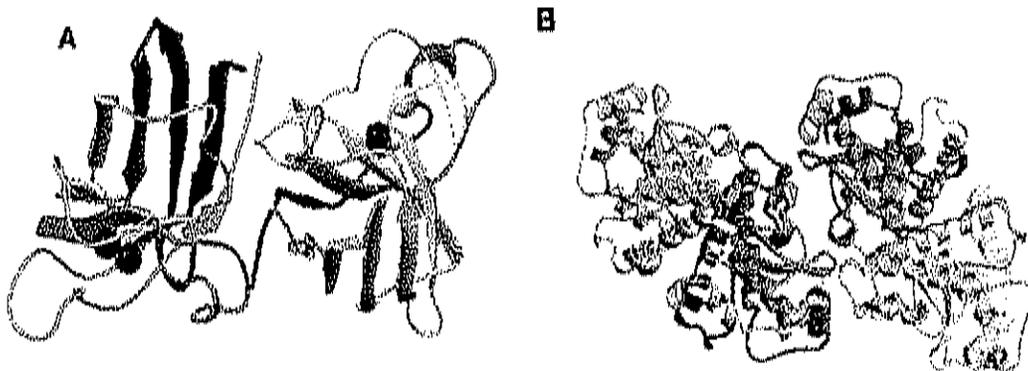


Figura 3. Estructura tridimensional de dos SOD coordinando diferente ión: A) Manganeso (PDB: 1D5N) y B) cobre y zinc (PDB: 1CB4).

## Herramientas Moleculares y Biofísicas en Estudios de Estructuras Proteicas

### **Sobreexpresión y Replegamiento de Proteínas Recombinantes**

La obtención a gran escala de la mayoría de los polipéptidos de origen eucariota con alguna aplicación clínica, industrial o en la investigación, puede verse limitada debido su baja disponibilidad natural. O bien, el costo de su purificación a partir del tejido natural puede ser excesivo y el proceso complicado. Afortunadamente, con la ayuda de la ingeniería genética y la biotecnología, es posible la expresión de genes en sistemas bacterianos (*E. coli*) y eucariotas (levaduras, células de mamíferos e insectos) para obtener grandes cantidades de estos productos. Sin embargo, en la expresión bacteriana la proteína de interés se puede obtener en forma de cuerpos de inclusión. Estos son agregados proteicos inactivos e insolubles que se forman intracelularmente por un exceso en la cantidad de proteína producida, o bien, cuando el producto activo resulta tóxico para el hospedero (Villaverde y Carrió, 2003). En el caso de proteínas que contienen enlaces disulfuro en su estructura estable, la formación de los cuerpos de inclusión es prácticamente inevitable. Debido al ambiente reductor del citoplasma de la *E. coli*, la formación de enlaces disulfuro es muy poco probable, causando la agregación de la proteína recombinante (Lilie *et al.*, 1998).

La expresión de proteínas recombinantes como cuerpos de inclusión es ventajosa ya que la proteína de interés puede alcanzar niveles del 50% o más de la proteína total. Debido al estado de agregación en el que se encuentra la proteína es resistente a la proteólisis, además es de fácil extracción y purificación (Lilie *et al.*, 1998). La estrategia general para recuperar la proteína activa a partir de cuerpos de inclusión incluye tres etapas. 1) El *Aislamiento y lavado* consiste en el rompimiento de las células que contienen los cuerpos de inclusión, ya sea mediante homogenización, sonicación o lisis bacteriana. El precipitado recuperado es sometido a varios lavados con detergentes (Triton X-100, dodecil sulfato de sodio; SDS) o bajas concentraciones de agentes caotrópicos para remover las proteínas contaminantes. 2) *Solubilización del agregado proteico*, se realiza

con agentes desnaturizantes fuertes como el guanidinio-hidroclorado (GND-HCl) o la urea, ambos a concentraciones elevadas (p.e. 8 M), acompañados de agentes reductores como  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) o ditiotreitól (DTT). 3) *Renaturalización o replegamiento ("refolding")*; esta etapa es la más crítica y consiste en someter a la proteína desnaturizada a condiciones artificiales que favorecen su replegamiento. La solución de replegamiento contiene cantidades adecuadas de agentes químicos con la finalidad de que la proteína recupere su estructura biológicamente activa (Clark, 1998).

Por lo general se utilizan varios métodos de replegamiento como son la dilución, diálisis, diafiltración, entre otros. En particular, el método más práctico para el replegamiento de proteínas recombinantes es el método de dilución. Sin embargo, el rendimiento es bajo ya que se forman agregados de intermediarios parcialmente plegados, por lo que la cantidad de proteína con una estructura completamente plegada disminuye notablemente (Buswell y Middelberg, 2003). Este fenómeno se acentúa cuando la proteína contiene enlaces disulfuro (S-S) en su estructura. El replegamiento de este tipo de proteínas consiste básicamente en lograr que estos enlaces tomen su conformación "original" o "nativa". Por lo tanto, la solución de replegamiento debe contener sistemas que regulen la formación de S-S. Para solucionar este problema se utilizan agentes "reguladores" químicos como los complejos glutatión oxidado-reducido o el cistina-cisteína, los cuales han sido utilizados exitosamente en el replegamiento de proteínas con S-S. Estos compuestos actúan como intercambiadores ("*shuffling*") de protones en la formación de los disulfuros y se ha encontrado que mejoran el rendimiento del proceso (Figura 4) (Clark, 1998).

Como se mencionó anteriormente, el plegamiento *in vitro* de proteínas desnaturizadas consiste en someter a la proteína a condiciones en las cuales la molécula tome su confirmación nativa. Sin embargo el proceso de replegamiento es muy complejo. Durante este proceso se han detectado intermediarios unidos principalmente por enlaces no covalentes que se forman y deshacen constantemente. Es decir, son compuestos

inestables y por lo tanto, sus propiedades son complicadas de estudiar (Fersht, 1999). No obstante, se ha estudiado el mecanismo de replegamiento de varias enzimas como la ribonucleasa A (Anfinsen, 1973), barnasa (Bond *et al.*, 1997) y lisozima (Radford *et al.*, 1992). En el caso particular de la lisozima, Radford *et al.* (1992), estudiaron a esta enzima con técnicas rápidas como espectropolarimetría de CD en flujo detenido ("stopped-flow") tanto en UV-lejano como cercano acoplado con experimentos de pulso de intercambio de hidrógeno marcado. Estos autores sugieren que el replegamiento de la lisozima no ocurre en un evento simple-único y secuencial. Es decir, el mecanismo es más complejo e incluye rutas alternativas y paralelas que generan poblaciones de moléculas variadas durante este proceso (Radford *et al.*, 1992).

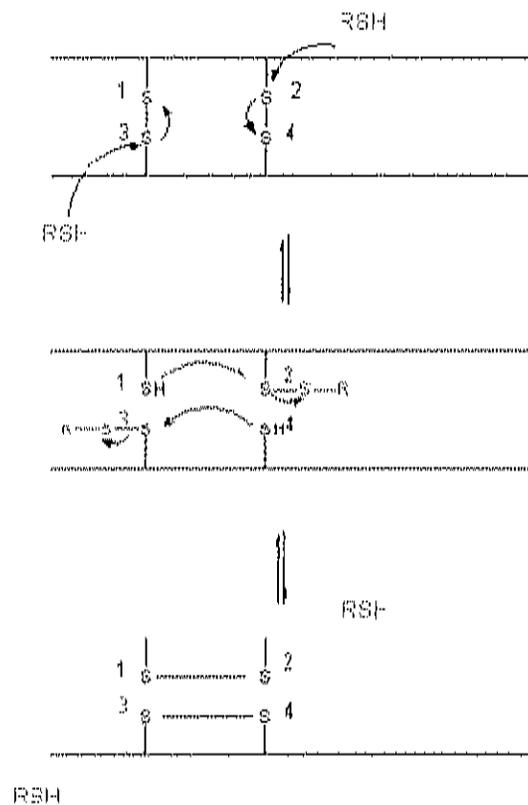


Figura 4. Intercambio (reacomodo) de disulfuros durante el replegamiento. R, glutation reducido y oxidado o cistina y cisteína; 1,2,3,4 son grupos sulfhidrilos.

La barnasa es una ribonucleasa secretada por *Bacillus amyloliquefaciens* que está compuesta por dos dominios: uno rico en hélices- $\alpha$  expuesto al medio y el otro formado por hojas- $\beta$  ubicado en el centro de la molécula. Mediante RMN y simulaciones con técnicas de dinámica molecular ha sido posible identificar y caracterizar algunos intermediarios del proceso de replegamiento. En la figura 5 se muestran las diferentes estructuras de los estadios del replegamiento, los cuales han sido denominados: *desnaturalizado*, *intermediario*, *estado de transición* y *nativo*. Aparentemente el mecanismo es secuencial y definido; sin embargo, Bond *et al* (1997), concluyen que es probable que la forma en que se lleva a cabo el replegamiento ocurra por varias rutas (Bond *et al.*, 1997).

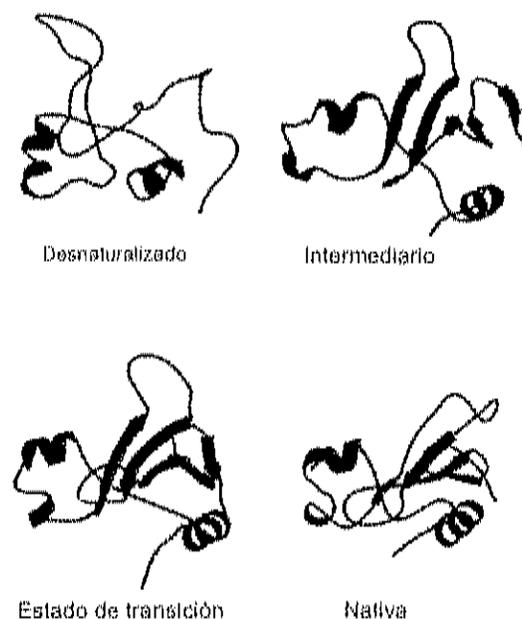


Figura 5. Estructuras de los diferentes estadios del replegamiento de Barnasa mediante NMR y dinámica molecular. Tomado de Fersht, (1999).

Una de las teorías existentes acerca de los fenómenos que rigen el plegamiento de proteínas es la llamada "hipótesis termodinámica" (Anfinsen, 1973). Esta hipótesis establece que "*la estructura tridimensional de una proteína nativa en su medio natural (solvente, pH, fuerza iónica, grupos prostéticos, etc.) es la única en la cual la energía libre de Gibbs de todo el sistema es la más baja*" (Anfinsen, 1973). Es decir, la conformación nativa está determinada por la totalidad de interacciones entre la secuencia de aminoácidos y un medio dado que da origen a una molécula termodinámicamente más estable<sup>1</sup>. Por lo tanto, es de suma importancia el entendimiento de los procesos de agregación y la caracterización de los intermediarios que se forman y ocurren durante el replegamiento de proteínas *in vitro*. Como se mencionó anteriormente, la formación completa y adecuada de la estructura de una proteína es esencial para que esta realice su función.

### **Técnicas Biofísicas para el Estudio de Estructuras de Proteínas**

En la década de los 40's Max Perutz fue uno de los pioneros en los estudios de cristalografía de rayos-X en moléculas proteicas, específicamente en hemoglobina. A partir de esto, la cristalografía de rayos-X ha sido una de las herramientas más utilizadas para determinar la estructura espacial de una proteína. Esta herramienta y la resonancia magnética nuclear (RMN) tienen una alta resolución, es decir, permiten conocer la ubicación espacial que ocupan los átomos que componen a la proteína (Wuthrich, 1990). Ambas herramientas tienen ventajas y desventajas que dependen del tipo de estudio que se desea realizar. La cristalografía de rayos-X requiere de la formación de un cristal de la proteína, pero no tiene restricciones por el tamaño de la proteína. Por otro lado, la RMN está limitada a proteínas pequeñas (<30kDa), ya que la calidad de los datos disminuye conforme aumenta la masa molecular de la proteína. La ventaja de la RMN es que los estudios se realizan con la proteína en solución, esto la hace un excelente candidato para estudiar la cinética de plegamiento de proteínas (Fersht, 1999).

---

<sup>1</sup> Para más información acerca de las fuerzas que participan en el plegamiento y estabilidad de las proteínas, vea Dill, K. A. (1990). "Dominant forces in protein folding." *Biochemistry* 29(31): 7133-55.

En la actualidad existen más de 23,000 estructuras de proteínas depositadas en el banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*), de éstas, la mayoría han sido resueltas por cristalografía de rayos-X. Esta herramienta ha sido de gran ayuda en la elucidación de mecanismos enzimáticos, además, se han podido observar los movimientos conformacionales de los aminoácidos en la vecindad del sitio activo y el sustrato al momento en que se lleva a cabo la catálisis (Hammes, 2002). Sin lugar a duda, las herramientas espectroscópicas han sido participes en dichos logros, además, son un buen primer acercamiento durante el proceso de caracterización estructural de las proteínas.

Estructuras proteicas en solución: espectroscopia de dicroísmo circular. Las proteínas y por lo tanto las enzimas son biomoléculas dinámicas. Entonces, la estructura en solución es la que define la función. La estructura de varias proteínas se han resuelto tanto en solución (RMN) como a partir del cristal (rayos-X), y la correspondencia es muy elevada (Fersht, 1999). Como alternativa y complemento de las herramientas estructurales antes discutidas, se han implementado técnicas espectrofotométricas para obtener información estructural de las proteínas; las cuales han sido útiles para enriquecer los estudios realizados con las técnicas de alta resolución. Por ejemplo, los movimientos conformacionales durante la unión y catálisis del sustrato son detectables por estos métodos. Así mismo, es posible identificar la formación de los intermediarios durante el plegamiento de proteínas, entre otras características, ventajas y desventajas que serán discutidas mas adelante.

La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) y de fluorescencia son algunas de las técnicas biofísicas más utilizadas para el estudio de proteínas en solución. De acuerdo a los fines de este trabajo solo se discutirá lo correspondiente al CD. Por definición la espectroscopia de CD es la diferencia en absorción de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y derecha que incide sobre una molécula con componentes quirales. Es

decir, el espectro de CD depende de la orientación y ubicación de los cromóforos que contiene la molécula que se analiza (Rodger, 2000). Los estudios de CD en proteínas se dividen en dos regiones espectrales y cada una de ellas proporciona información importante sobre la estructura de las proteínas.

UV-LEJANO (240-180 nm). El principal cromóforo en esta región corresponde a la absorción del enlace peptídico, por lo tanto se obtiene información respecto a la estructura secundaria de la proteína. Cabe señalar que el CD no proporciona información acerca de la ubicación de este tipo de estructuras a lo largo de la cadena proteica (Woody, 1995). Sin embargo, se ha determinado que los péptidos y proteínas con una estructura secundaria regular exhiben diferentes espectros de CD característicos (Figura 6). Además, el CD combinado con algoritmos de predicción de estructura secundaria permite estimar el contenido de estructura secundaria de las proteínas en solución (Hennessey y Johnson, 1981; Sreerama y Woody, 1993).

El análisis de CD en el UV lejano ha sido de utilidad par determinar los cambios estructurales durante la función de las proteínas. Por ejemplo, la troponina A es una proteína sarcoplasmática que une calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) y esta involucrada en el proceso de contracción muscular (Grabarek *et al.*, 1981). El N-terminal une específicamente  $\text{Ca}^{++}$  y mediante cristalografía de rayos-X se ha determinado que durante la unión hay cambios estructurales en la proteína (Herzberg *et al.*, 1986). Murray y Kay (1972) realizaron estudios de CD en el UV-lejano de la interacción de la proteína con  $\text{Ca}^{++}$ , y encontraron que el contenido de hélices- $\alpha$  aumenta un 58% cuando la enzima está en condiciones saturantes de  $\text{Ca}^{++}$  (Murray y Kay, 1972). Por otro lado, el CD en el UV-lejano ha sido de gran utilidad en estudios de plegamiento de proteínas. Con técnicas rápidas como el CD con flujo detenido, ha sido posible identificar los intermediarios que se forman en las primeras etapas (milisegundos) del plegamiento (Kelly y Price, 1997; Woody, 2004).

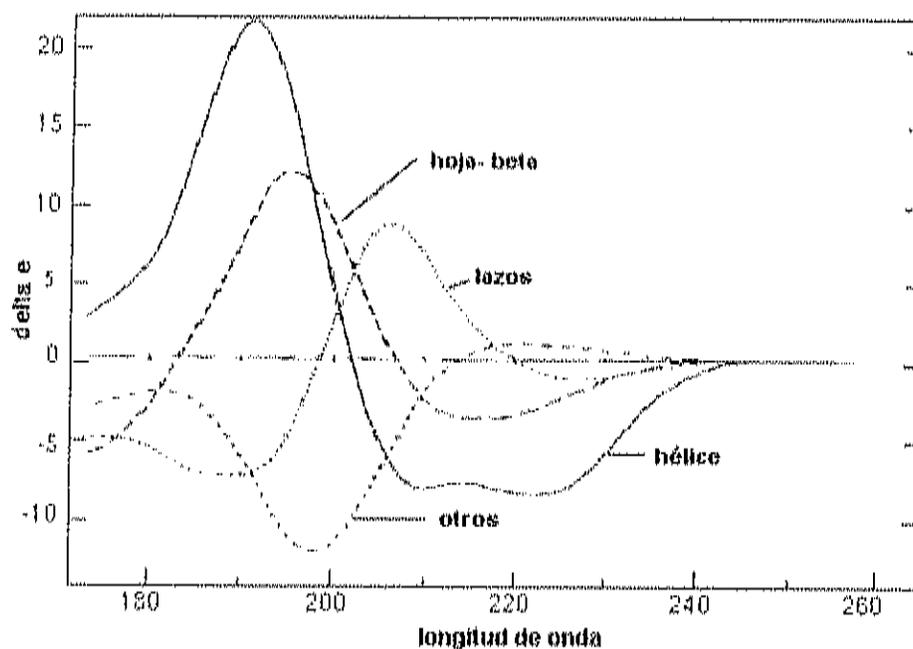


Figura 6. Espectros típicos de CD de los diferentes tipos de estructuras secundarias de proteínas. Tomado de Kelly y Price, (2000).

Así mismo, los resultados obtenidos por CD combinados con otras herramientas estructurales han permitido estimar posibles mecanismos de plegamiento (Itzhaki *et al.*, 1994; Yamasaki *et al.*, 1995).

UV-CERCANO (320-260 nm). En esta región se detecta la señal generada por los residuos de aminoácidos aromáticos (Trp, Phe y Tyr). El análisis de CD en la región del UV-cercano se utiliza comúnmente para adquirir información respecto a la estructura terciaria de la proteína (Kelly y Price, 1997). Esto se refiere a las modificaciones conformacionales que se producen durante la interacción proteína-ligando, proteína-proteína, o bien el efecto de algún componente del medio. Cada residuo de aminoácido aromático absorbe en una longitud de onda específica. El Trp presenta una señal máxima a los 290 nm, la Tyr entre los 275 y 282 nm, y la Phe en el rango de 255-270 nm (Adler *et al.*, 1973). Algunos otros cofactores no proteicos como las flavinas (FAD), grupo

hemo, piridoxal fosfato, entre otros también absorben en esta región. Los espectros de CD de estos cromóforos han sido de mucha utilidad para obtener información respecto al ambiente proteico con el que interaccionan (Woody, 1995).

La principal ventaja del CD sobre cristalografía de rayos-X y RMN es que una técnica estructural que requiere de cantidades relativamente bajas de proteína y es muy rápida. Además, la manipulación y procesamiento de los datos es mas sencillo que las herramientas de alta resolución (Kelly y Price, 2000). Por la rapidez de las mediciones, permite evaluar el efecto de una mutación de un aminoácido sobre la estructura secundaria o terciaria de una proteína, y a partir de esto realizar estudios más detallados (rayos-X o RMN) acerca de ese efecto sobre integridad de la proteína. Sin embargo, es necesario tener algunas consideraciones cuando se realizan las mediciones del espectro de CD de proteínas. Algunas soluciones amortiguadoras tienen una elevada absorbancia por debajo de los 200 nm. El agua es el solvente por excelencia para realizar las mediciones; los amortiguadores como Tris, acetatos, boratos y fosfatos deben utilizarse a bajas concentraciones (10 mM). El cloruro de sodio no es recomendable, por lo general se utilizan sales de sulfatos para mantener la fuerza iónica. Aun así, es necesario tomar en cuenta una corrida blanco para minimizar el error del disolvente (Woody, 1995).

El espectro de CD es una suma de las elipticidades de todas las moléculas que se encuentren en la solución. Por lo tanto, es muy importante el grado de pureza de la muestra; además, se recomienda que la solución proteica sea filtrada (0.22  $\mu\text{m}$ ) o bien centrifugada para eliminar la partículas suspendidas que puedan causar un efecto de dispersión de la luz (Kelly y Price, 1997). Los requerimientos de cantidad de proteína dependen del rango del UV, el tipo de celda y por supuesto de la sensibilidad del equipo seleccionado para el análisis. En general, para cualquier medición del espectro de CD, la concentración de la muestra no debe exceder de una unidad de absorbancia a 280 nm. Para el CD en el UV-cercano la cantidad de proteína en la celda puede ser tan baja como 10  $\mu\text{g}$ , sin embargo, esto depende de la sensibilidad del equipo que se utilice. La señal en

el CD de UV-cercano es más débil, por lo que se requieren cantidades y volúmenes mayores respecto al CD en el UV-lejano. Frecuentemente se utiliza una concentración de proteína entre 0.5-2.0 mg/mL, las celdas que se utilizan tiene paso de luz de 0.5-2.0 cm; por lo tanto los requerimientos de proteína son mayores.

Como se menciona anteriormente, el CD puede combinarse con algoritmos de predicción de estructura secundaria. Usualmente, estos métodos incluyen en sus cálculos la masa molecular promedio de los aminoácidos que componen la proteína así como la concentración de proteína. Los métodos para estimar concentración de proteína aceptados son Lowry (Lowry *et al.*, 1951), ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985) y biuret, siempre y cuando se tenga mucho cuidado con la construcción del estándar proteico (Adler *et al.*, 1973). El método más confiable para ajustar la concentración de proteína es por absorbancia a 280 nm, pero que requiere del conocimiento previo del coeficiente de extinción molar de la molécula (Kelly y Price, 1997).

En conclusión, el CD permite obtener información confiable de la estructura secundaria, un punto muy importante en la caracterización estructural de proteínas. Así mismo, el CD acoplado a flujo detenido puede contribuir a la exploración y comprensión de los mecanismos que rigen el plegamiento de proteínas; dicho conocimiento es de gran utilidad en el campo de la síntesis *de novo* de proteínas (ingeniería de proteínas). Por último, esta técnica en conjunto con la espectroscopia de fluorescencia, RMN o cristalografía de rayos-X pueden contribuir a un mejor entendimiento de la complejidad estructural de la proteínas y su relación con el medio.

## La Lisozima como Modelo para Estudios de Estructura-Función en Proteínas

La lisozima ha sido objeto de estudio para entender la relación existente entre la estructura y la función de las enzimas. El mecanismo de catálisis de esta enzima fue descrito a partir de las observaciones cristalográficas de su estructura tridimensional. A partir de estos estudios, fue evidente que las moléculas biológicamente activas requieren de una estructura única y definida para llevar a cabo su función. A continuación se hace una breve descripción de algunas características funcionales, catalíticas y estructurales de esta enzima por las cuales es considerada como modelo de estudio de la relación estructura-función.

### **Función y Clasificación**

La lisozima (EC. 3.2.1.17) es una glicohidrolasa que fue descubierta por Fleming en 1922 y es considerada como una enzima antibacteriana (Jolles y Jolles, 1984). Se define como una 1,4- $\beta$ -acetil muramidasa, ya que cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$  1-4 entre el C-1 del ácido N-acetil murámico (NAM) y el C-4 de la N-acetil glucosamina (NAG) (Figura 7). Sin embargo, algunas lisozimas también tienen actividad de quitinasa (Howard y Glazer, 1969; Bernier *et al.*, 1971), esto es la hidrólisis al azar de enlaces  $\beta$ ,1-4 de N-acetil glucosamina presentes en la quitina. Tal característica se ha observado en rumiantes y algunos insectos, por lo que también se ha considerado como una enzima digestiva (Ito *et al.*, 1995; Regel *et al.*, 1998). Por otro lado, en frutos y raíces se cree que participa en el sistema de defensa de la planta contra el ataque de hongos patógenos, los cuales contienen quitina en su pared celular (Jolles y Jolles, 1984).

También se ha aislado la lisozima de mamíferos superiores como el humano y algunos rumiantes, entre otros. La presencia y niveles elevados de esta enzima en algunas secreciones se han relacionado con el padecimiento de diversas enfermedades en humanos. Por ejemplo, los niveles elevados de lisozima en la orina se asocian con la respuesta anti-tumoral de los macrófagos (Osserman *et al.*, 1973). Se ha observado que

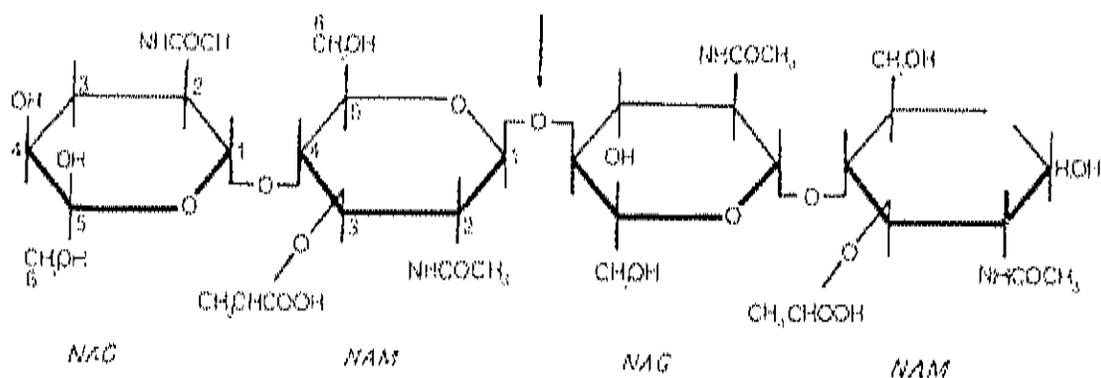


Figura 7. Sitio de hidrólisis de la lisozima en el péptidoglicano bacteriano. El sitio de corte se indica con la flecha. Tomado de Blake *et al.*, (1967).

estos últimos secretan lisozima, la cual es detectable en la orina en individuos con este padecimiento (Gordon *et al.*, 1974). Hankiewicz *et al.* (1974), sugieren que la actividad de lisozima no es detectable en la orina bajo condiciones normales (Hankiewicz y Swierczek, 1974); por esto, se considera que la lisozima podría ser un indicador de esta enfermedad (Gordon *et al.*, 1974). En otros organismos superiores se ha asociado a la lisozima con funciones digestivas. Dobson *et al.* (1984), estudiaron ampliamente la lisozima de estómago de bovino. Estos investigadores encontraron que esta enzima es estable bajo las condiciones de pH ácido del rumen bovino (pH óptimo 4.5), y además, es resistente a la digestión por la pepsina. Debido a esto, se propone que la lisozima degrada las bacterias del rumen (función digestiva) para su posterior digestión por otras enzimas del estómago bovino (Dobson *et al.*, 1984).

La lisozima es una enzima ubicua y ha sido estudiada principalmente en huevos de aves, aunque también se ha aislado de insectos, invertebrados, mamíferos y bacterias. Se han clasificado en varios tipos, como son lisozima: de clara de huevo de gallina (HEWL; tipo *c*), de clara de huevo de ganso (GHWL; tipo *g*); de *fago*, de *plantas e invertebrados* (Canfield, 1963; Dianoux y Jolles, 1967; Jolles y Jolles, 1984). Las diferencias más notables entre un tipo y otro se refieren principalmente a la secuencia, masa molecular y

especificidad catalítica. Por ejemplo, la lisozima tipo *fago* tiene un peso molecular de 18.7 kDa (Inouye *et al.*, 1970) y es capaz de degradar más eficazmente la pared celular de *E. coli* que las de tipo *c*, las cuales tienen una masa molecular de aproximadamente 14.4 kDa (Matthews *et al.*, 1981).

### **Estructura y Mecanismo Catalítico**

La lisozima fue la primera enzima a la que se le determinó su estructura tridimensional mediante cristalografía de rayos-X (Blake *et al.*, 1965). Es una proteína globular que tiene cuatro puentes disulfuro en su estructura y está compuesta principalmente por aminoácidos básicos. La estructura secundaria es muy conservada entre cada tipo (*c*, *g*, etc.) y consiste principalmente de lazos que conectan los diferentes dominios de estructura secundaria. Por ejemplo, en las lisozimas tipo *c* el contenido de hélices- $\alpha$  se conserva entre el 30 y 36%, mientras que las hojas- $\beta$  se encuentran en menor proporción (2-13%). Se ha determinado la estructura cristalográfica de muchas lisozimas, principalmente de tipo *c*, algunas de tipo *g* y solo la lisozima de bacteriófago T4 correspondiente al tipo *fago*. Dentro de las tipo *c*, solo dos estructuras cristalográficas de lisozima de insectos han sido resueltas, la del gusano de seda Tassar (*Antheraea milliyta*) (Jain *et al.*, 2001) y la del gusano de seda (*Bombyx mori*) (Matsuura *et al.*, 2002).

El mecanismo catalítico de la lisozima ha sido ampliamente estudiado (Rupley, 1967; Sharon, 1967; Matsumura y Kirsch, 1996) y fue la primera enzima a la que se le determinó su mecanismo catalítico (Phillips, 1966; Blake *et al.*, 1967). El sitio activo de la lisozima está compuesto por 6 sitios de unión denominados: **A**, **B**, **C**, **D**, **E** y **F**. Por lo tanto, necesita 6 unidades del oligosacárido formado de NAG y NAM -cada uno correspondiente a un subsitio catalítico de la lisozima- para realizar la catálisis adecuadamente. La hidrólisis del polisacárido se lleva a cabo entre los subsitios **D** y **E**, es decir entre el monómero 4 y 5 del sustrato correspondiente. La lisozima de huevo también puede unir cadenas más cortas -dímeros, trímeros y tetrameros- de NAG o en combinación con NAM, sin embargo, es incapaz de hidrolizar esos oligómeros (Sharon,

1967). El resto de los subsitios mencionados se han identificado como necesarios para la unión del sustrato durante la catálisis (Phillips, 1966; Blake *et al.*, 1967).

Los residuos catalíticos de las lisozimas tipo *c* son el ácido glutámico en la posición 35 (E35) y aspártico en la 52 (D52) (Blake *et al.*, 1967), por lo tanto, se encuentran en la vecindad de los subsitios **D** y **E**. Estos aminoácidos son muy conservados entre las lisozimas de diversas especies y solo varían en la posición en la que se encuentran. Por ejemplo, la lisozima del fago T4 tiene los residuos Glu y Asp en la posición 11 y 45 respectivamente (Matthews *et al.*, 1981). Básicamente la ruptura del oligosacárido es una reacción de hidrólisis, en la que el carbohidrato en la posición 4 se distorsiona ligeramente de su posición original por E35 (Figura 8). El enlace -O-(glucosídico) entre la unidad 4 y 5 se rompe por efecto de E35 mediante la transferencia de un protón ( $H^+$ ) al C-4 de la unidad 5 (NAG) (A). El resto del oligosacárido (unidad 4, NAM) forma un intermediario inestable con Glu 35. Este intermediario se estabiliza temporalmente por la carga negativa del carboxilato de D52 (B). Posteriormente una molécula de agua se disocia y reemplaza el protón faltante de E35. El grupo hidroxilo libre ( $OH^-$ ) ataca al C-1 del carbohidrato en la posición 4 (C) y se libera el resto del oligosacárido. Los residuos catalíticos y el resto de los aminoácidos de los sitios de unión quedan disponibles para iniciar un nuevo ciclo catalítico (D).

Si bien el mecanismo catalítico de la lisozima se elucidó hace varias décadas, aún se han agregado nuevos componentes al mecanismo clásico propuesto por Phillips en 1966. Vocadlo *et al.* (2001), mediante cristalografía de rayos-X revelan la formación de un enlace covalente durante el ciclo catalítico de HEWL (Vocadlo *et al.*, 2001). Estos autores sugieren que la lisozima forma un intermediario covalente con el sustrato, tal como lo hacen otras  $\beta$ -glicosidasas durante su función.

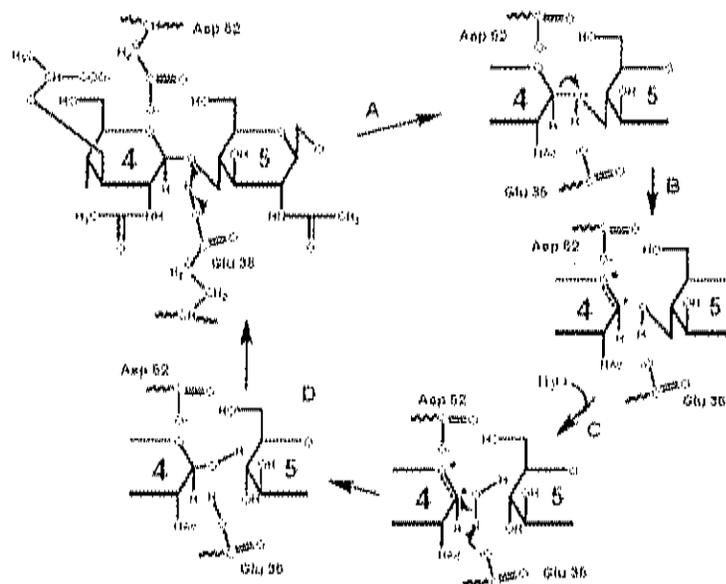


Figura 8. Mecanismo catalítico de HEWL. Se muestran los residuos de aminoácidos catalíticos (Glu 35 y Asp 52) y las subunidades 4 (NAM) y 5 (NAG) del sustrato. Tomado de: <http://www.olemiss.edu/courses/chem471/Lecture22.pdf>.

El D52 se considera como un aminoácido esencial para la catálisis tanto en la HEWL (tipo *c*) y su contraparte en GEWL (tipo *g*). Estas enzimas difieren principalmente en la especificidad por el sustrato. Mientras que la HEWL puede hidrolizar enlaces glicosídicos del peptidoglicano bacteriano y derivados de la quitina, la GEWL es específica solo para el peptidoglicano bacteriano (Arnheim *et al.*, 1973). Se crearon mutantes (D52R) de ambas enzimas y se encontró que conservaron el 4 % de la actividad enzimática respecto a las enzimas nativas. En base a esto, Matsumura y Kirch (1996) sugieren que la catálisis es posible mediante la colaboración del grupo carboxilo libre de una glicina unida al NAM en el ensayo de actividad con péptidoglicano de *M. luteus*. Es decir, este residuo sustituye parcialmente la función que desempeña D52 durante la catálisis, contrario a lo propuesto por Phillips D.C. en 1966 (Matsumura y Kirsch, 1996).

La lisozima es una molécula considerada como modelo para estudios estructurales, cinéticos, así como clínicos. Si bien, esta enzima ha sido ampliamente estudiada en estas

disciplinas y otras, aun es evidente que son necesarias más investigaciones, sobre todo, mediante un enfoque multidisciplinario. Lo que se conoce como “la segunda parte del código genético” o “expresión estructural del genoma” (*structural genomics*), esto es la relación existente entre la estructura y la función de una proteína, es aún un desafío científico. Desde la determinación de la secuencia aminoacídica, la estructura tridimensional y del mecanismo catalítico de HEWL en la década de los 60's, se ha venido trabajando en ello. Sin embargo, con el descubrimiento y caracterización de lisozima en otros organismos se han encontrado nuevas características y adaptaciones evolutivas de esta enzima. Por lo que, son necesarios mas estudios para entender cual ha sido el mecanismo, adaptativo o evolutivo, de dicho comportamiento desde un punto de vista multidisciplinario.

### Lisozima en Insectos

La secuencia, estructuras cristalográficas, estudios de estructura-función e inmunológicos han sido ampliamente analizados en lisozimas de vertebrados. Específicamente, la HEWL ha sido más estudiada, sin embargo, también se ha identificado la presencia de lisozima en muchos invertebrados. Dentro de este grupo de organismos se encuentran los insectos, los cuales son el grupo de organismos más abundantes en la biosfera. Debido a esto han sido extensivamente estudiados y se han tomado como modelo en estudios genéticos (Handler, 2001; Ffrench-Constant *et al.*, 2004), evolutivos (Patel, 1994), inmunológicos (Hultmark, 1993; Barillas-Mury *et al.*, 2000) y bioquímicos (Law y Wells, 1989). Por ejemplo, en *Manduca sexta* ha sido posible determinar la funcionalidad de las lipoproteínas (llamadas lipoforinas) y otras moléculas involucradas en el transporte y almacenamiento de lípidos. Esto ha sido de gran ayuda para entender como estos organismos y otros relacionados, han utilizado el metabolismo de lípidos durante la evolución (Law *et al.*, 1992).

Todos los organismos continuamente están expuestos al ataque de microorganismos patógenos por lo que requieren de un sistema efectivo y regulado para controlar y eliminar la infección. Los invertebrados -como los insectos- no tienen inmunoglobulinas, pero se ha detectado la presencia de péptidos y proteínas antibacterianas involucradas en resolver la infección (Gillespie *et al.*, 1997). Jolles *et al* (1979) realizaron los primeros trabajos en la identificación de proteínas antibacterianas en insectos. Estudiaron a tres insectos del orden *Lepidoptera* y demostraron que la lisozima es una de las moléculas involucradas en el sistema de defensa. Así mismo encontraron que las tres enzimas son homólogas a la lisozima tipo *c* concluyendo que podrían tener un ancestro común respecto HEWL (Jolles *et al.*, 1979).

La lisozima forma parte del sistema de defensa innato de los insectos. La secuencia de la proteína, el cDNA (Boman *et al.*, 1985) así como la inducción de la expresión del gen de lisozima han sido reportados en *Hyalophora cecropia* (Sun *et al.*, 1991). Recientemente, se ha estudiado la inducción de la expresión de lisozima en *Heliothis virescens* (Chung y Ourth, 2000). En este estudio encontraron que la actividad de lisozima en la hemolinfa de este insecto aumenta 54 veces después de una infección bacteriana. Así mismo en *Manduca sexta*, se ha estudiado a detalle la regulación de la expresión del gen de lisozima en organismos sometidos a tratamientos con peptidoglicanos. Además, se ha identificado que el cuerpo gordo como el principal sitio de síntesis de lisozima en este insecto (Mulnix y Dunn, 1994).

A nivel de secuencia, las lisozimas de insectos aisladas hasta la fecha pertenecen al tipo *c*, con una identidad de secuencia de aminoácidos del 30% o más respecto a HEWL. Como se mencionó anteriormente, solo dos estructuras tridimensionales de lisozima de insectos se han determinado la de *A. myllita* (PDB: 1HIZ) y la de *B. mori* (PDB: 1GD6). En ambas enzimas se observó que poseen una arquitectura estructural similar a HEWL, sin embargo, tienen algunas características catalíticas, enzimáticas y regiones estructurales distintas a HEWL. En un estudio comparativo entre lisozimas de tres

insectos realizado por Yu *et al* (2002), se encontró que estas lisozimas son capaces de degradar bacterias Gram (-) con mayor efectividad que HEWL. Mediante ensayos con anticuerpos anti-lisozima de *Galleria mellonella* se observó reactividad cruzada con la lisozima de los otros dos insectos (*B. mori* y *Agrius convolvuli*), mientras que con la HEWL no se detectó reacción. Estos autores concluyen que las lisozimas de estos insectos tienen una "región" (*motif*) estructural común que no existe en HEWL, el cual puede ser el responsable del comportamiento antibacteriano observado (Yu *et al.*, 2002).

Recientemente se ha encontrado que la lisozima del gusano de la seda (*B. mori*; Bmlis) presenta características bioquímicas y estructurales similares a las enzimas psicrófilicas ("cold-adapted") (Matsuura *et al.*, 2002). Por ejemplo, las glicosidasas son enzimas que se caracterizan por tener eficiencias catalíticas elevadas a bajas temperaturas (Collins *et al.*, 2003; Georlette *et al.*, 2004). Las teorías actuales proponen que dichas propiedades son debidas a la flexibilidad estructural de la proteína. Es decir, la flexibilidad favorece movimientos moleculares necesarios para que la enzima realice su función en ambientes de bajo nivel energético. Sin embargo, esta flexibilidad o relajamiento estructural tiene como consecuencia que este tipo de enzimas posean baja estabilidad térmica (Fields, 2001).

En un estudio realizado por Masaki *et al* (2001), se evaluó la estabilidad térmica de Bmlis mediante calorimetría diferencial de barrido. Se encontró que la temperatura de desnaturalización de Bmlis fue de 17 a 26°C mas baja que la lisozima de humano y HEWL (Masaki *et al.*, 2001). En el mismo grupo de investigación, Matsuura *et al* (2002), analizaron las propiedades catalíticas y estructurales de Bmlis. Estos autores reportaron que esta enzima posee mayor capacidad catalítica a bajas temperaturas en comparación con HEWL. La actividad lítica de Bmlis a 15°C fue 4.5 y 1.8 veces mayor utilizando como sustratos *M. luteus* y glicol quitina, respectivamente (Figura 9). Así mismo, la estructura tridimensional de Bmlis muestra diferencias en dos lazos expuestos al medio y en la región del C-terminal. Estos autores sugieren que tales diferencias podrían estar

relacionadas con la eficiente catálisis a bajas temperaturas de la lisozima de este insecto (Matsuura *et al.*, 2002). La relación entre actividad, flexibilidad y estabilidad representa un papel central en la adaptación de las proteínas a ambientes aparentemente adversos. Las proteínas necesitan de una estructura compacta y estable bajo esas condiciones, sin embargo, también es necesaria una estructura flexible, relajada que permita las alteraciones conformacionales necesarias para su función (Zavodszky *et al.*, 1998; Beadle y Shoichet, 2002).

Como se mencionó anteriormente, la lisozima es una enzima que ha sido objeto de una amplia variedad de estudios tanto a nivel bioquímico como molecular y estructural. Tales estudios están enfocados principalmente en entender los procesos involucrados en la

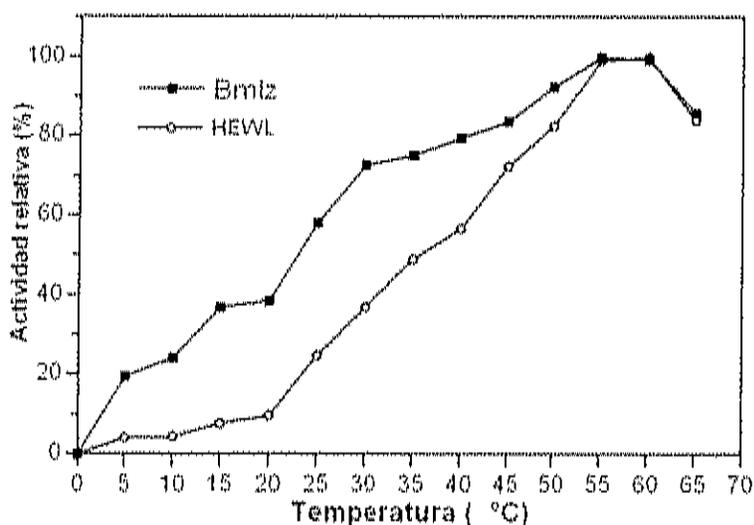


Figura 9. Actividad enzimática de Bmltz y HEWL en función de la temperatura utilizando *M. luteus* como sustrato. Tomada de Matsuura *et al.*, (2002).

funcionalidad fisiológica de la lisozima. Sin embargo, esta proteína también ha sido de gran importancia en estudios respecto a la relación existente entre la estructura y la función de las enzimas. Principalmente aquellas áreas de la ciencia que tienen como objetivo explicar los fenómenos involucrados en los mecanismos de plegamiento *in vitro* de proteínas. Desde la década de los 60's se detectó la presencia de lisozima en insectos. La similitud bioquímica y estructural es cercana a la de vertebrados como son las lisozimas tipo *c*. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que las lisozimas de insectos poseen propiedades bioquímicas y estructurales particulares que difieren de las lisozimas tipo *c*. Por lo tanto, la lisozima del gusano del tabaco (*M. sexta*) puede ser un modelo interesante en estudios bioquímicos, evolutivos, así como aquellos enfocados en tratar de explicar la relación entre la secuencia, estructura y función de las proteínas.

## HIPÓTESIS

*La lisozima de Manduca sexta presenta adaptaciones conformacionales y propiedades bioquímicas características en las lisozimas de invertebrados comparados con las de vertebrados*

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar bioquímica y biofísicamente la lisozima recombinante de *Manduca sexta*

### Objetivos Específicos

- Purificar la Mslis recombinante mediante técnicas cromatográficas.
- Determinar el pH y la temperatura óptima(o) de Mslis utilizando como sustrato *M. luteus*.
- Determinar el contenido de estructura secundaria mediante espectroscopía de dicroísmo circular en el UV-lejano de Mslis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Todos los reactivos que se utilizaron para el desarrollo de los experimentos de esta tesis fueron de grado biología molecular, U.V. o bioquímico de acuerdo a las necesidades de los experimentos. La lisozima de clara huevo de gallina (HEWL) y los *M. luteus* se compraron en Sigma-Aldrich. Los materiales empleados durante la purificación de la proteína fueron adquiridos en Pharmacia Bioscience, a menos que se especifique otro origen en el texto.

### Sobreexpresión y replegamiento

La sobreexpresión y el replegamiento de la lisozima de *Manduca sexta* (Mslis) se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Calderón-Arredondo (2003). En resumen, la Mslis fue clonada por la Dra. Islas-Osuna y sobreexpresada utilizando el sistema de expresión pET11a (Novagen) a partir del cDNA del gen de lisozima de *Manduca sexta* (donado por el Dr. Michael Kanost, Universidad de Kansas). Las bacterias transformadas (*E. coli* BL21) se crecieron a 37°C en medio de cultivo Luria-Bertani con agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Se agregó IPTG (concentración final de 0.4 mM) para inducir la expresión del gen de Mslis y la inducción se mantuvo por 12 h. Las células bacterianas se recuperaron por centrifugación a 5,000 x g por 5 min a 4°C y se lavaron con NaCl al 0.9 %. Las células se resuspendieron en bufer Tris-base 100 mM pH 8, EDTA 1 mM, PMSF 5 mM, benzamidina 5 mM y DTT 5 mM a una razón de 8 mL por gramo de precipitado. La suspensión bacteriana se sometió a sonicación con 4 pulsos de 10 s cada uno a 0°C y el lisado fue centrifugado a 10, 000 x g por 1 h a 4°C. El precipitado se lavó dos veces con Tris-HCl 50 mM pH 7.0, EDTA 5 mM, urea 2 M, DTT 5 mM y Triton X-100 al 2%, se utilizaron 4 mL de solución por

gramo de precipitado y se centrifugó a 22,000 x g por 30 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con la solución anterior sin Triton, se descartó el sobrenadante para obtener la Mslis en forma de cuerpos de inclusión. Estos se disolvieron en bufer de extracción (bufer de lavado con Gnd-HCl 8 M sin Triton X-100) utilizando 4 mL por gramo de precipitado (Calderon-Arredondo, 2003).

La concentración de Gnd-HCl se diluyó a 4 M utilizando el mismo bufer sin guanidinio. La solución se centrifugó a 22, 000 x g por 10 min a 4°C y se sometió a replegamiento por diálisis incubando la solución por 12 h en bufer de replegamiento (Armstrong *et al.*, 1999). La proteína replegada (activa) se centrifugó a 10,000 x g por 1 h a 4°C y se dializó exhaustivamente contra bufer de fosfato de sodio 50 mM pH 6.0 a 4°C, se centrifugó y el sobrenadante se almacenó a 4°C hasta su uso.

#### Purificación de la lisozima recombinante de *Manduca sexta*

Con la finalidad de realizar la caracterización de Mslis se procedió a purificar la proteína por técnicas cromatográficas. Todas las cromatografías se realizaron en un equipo de baja presión (Gradifrac 100, Pharmacia Biotech).

#### **Cromatografía de Afinidad**

Conjugación de *Micrococcus luteus* a la Matriz de Agarosa.- Se construyó una matriz de afinidad utilizando *M. luteus* inmovilizado en Mini-leak High (Kem-En-Tec, Copenhague Dinamarca). La bacteria se conjugó a la matriz de acuerdo al protocolo descrito para la inmovilización de N-acetilglucosamina en el manual Mini-leak para la inmovilización de moléculas biológicas (Kem-En-Tec, Copenhague Dinamarca).

Brevemente la metodología consistió en lo siguiente: se lavó la matriz Mini-leak High con 3-4 volúmenes de agua grado HPLC (milli Q) y se secó hasta que la matriz quedó

aparentemente libre de agua. Se preparó una suspensión de *M. luteus* (ligando) a una concentración de 0.16 g/mL en carbonato de sodio 1 M pH 11.0. Se mezcló el ligando con la matriz en una relación de 0.05-0.2 g. de ligando por gramo de matriz seca y se incubó por 12 h a temperatura ambiente con agitación lenta (sin agitador magnético). Se bloqueó el exceso de grupos activos adicionando etanolamina-HCl pH 11.0 a una concentración final de 0.1 M y se incubó por 2 h con agitación lenta a temperatura ambiente. El exceso de ligando se eliminó con lavados (2-3 volúmenes) de agua grado HPLC hasta que el sobrenadante se observó transparente. La matriz conjugada fue tratada con HEWL (5 mg/mL) con la finalidad de obtener mayor disponibilidad de grupos activos y aumentar la afinidad de la columna. La HEWL unida se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M.

Cromatografía de Afinidad a *Micrococcus luteus*.- Como una primera etapa de la purificación se sometió el extracto recombinante de Mslis a una cromatografía de afinidad. La matriz se empacó en una columna C10/10 a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. El volumen de cama fue 5.5 mL y la columna se equilibró con bufer de fosfato de sodio 50 mM pH 6.0 (bufer A). Se aplicó Mslis en bufer A a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. El material no unido o débilmente unido a la matriz se lavó con 5 volúmenes de columna con el bufer A o hasta que la absorbancia a 280 nm fue igual a la del bufer. La proteína se eluyó aplicando un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en el bufer A a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Se colectaron las fracciones (1 mL) de la elución y se les midió la absorbancia a 280 nm y actividad enzimática (Shugar, 1952). Las fracciones donde se detectó actividad se mezclaron y dializaron contra bufer de fosfato de sodio 50 mM pH 6.0 a 4°C y se cuantificó la concentración de proteína por el método de BCA (Smith *et al.*, 1985). Se verificó el grado de pureza de Mslis a homogeneidad electroforética por SDS-PAGE y los geles fueron teñidos con plata (Merril *et al.*, 1981).

### **Cromatografía de Intercambio Catiónico**

Las fracciones de elución de la etapa anterior con actividad de lisozima se aplicaron a una cromatografía de intercambio catiónico (SP sepharose). La matriz se empacó en una columna C10/10 a una velocidad de flujo de 1 mL/min. El volumen de cama fue de 8 mL y se equilibró con bufer A (5 volúmenes de columna). Se aplicó la muestra a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min hasta que la absorbancia a 280 nm fue igual a la del bufer. Para eluir la proteína unida se aplicó un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en el bufer A a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min. Se colectaron las fracciones (0.5 mL) de la elución y se les midió la absorbancia a 280 nm y actividad enzimática (Shugar, 1952). Las fracciones donde se detectó actividad se mezclaron y dializaron contra bufer de fosfato de sodio 50 mM pH 6.0 y se les cuantificó la concentración de proteína por el método de BCA (Smith *et al.*, 1985). Se verificó el grado de pureza de Mslis a homogeneidad electroforética por SDS-PAGE y tinción con plata (Merril *et al.*, 1981).

### Cuantificación de Proteína y Electroforesis

La concentración de proteína se determinó por el método del ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985) mediante un kit comercial (PIERCE, cat #: 23225) utilizando albúmina sérica bovina como estándar. El grado de pureza y los análisis electroforéticos se realizaron mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) con un gradiente de poliacrilamida del 10 al 20%.

### Ensayo de lisis de *Micrococcus luteus*

La actividad bacteriolítica se cuantificó basado en el ensayo turbidimétrico reportado por Shugar (1952) con ligeras modificaciones. El ensayo consistió en colocar 1.5 mL de una suspensión de *Micrococcus luteus* ( $O.D._{450nm} = 0.7$ ) en bufer de fosfato de sodio 50 mM pH 6.0 en una celda de cuarzo con agitador magnético. La reacción se inició con la adición de la enzima. Se registró la disminución de la absorbancia a 450 nm por 5 min a intervalos de 15 s. Se utilizó un espectrofotómetro Cary 50 (Varian) equipado con agitador magnético y con un controlador de temperatura tipo Peltier. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que causa un cambio de 0.001 unidades de absorbancia por minuto a 37°C (Shugar, 1952).

### Temperatura y pH óptimo

Se determinó la temperatura óptima de lisis de *M. luteus* de Mslis así como de HEWL en ensayos simultáneos. En ambos experimentos se utilizó un espectrofotómetro Cary 50 con un controlador automático de temperatura tipo Peltier. El intervalo de temperatura ensayado fue de los 5 a 55°C con incrementos de 5°C. La concentración de Mslis y de HEWL en la mezcla reacción fue 1  $\mu$ M y 7.5  $\mu$ M, respectivamente. Los resultados se expresan como unidades de actividad específica (U/mg de proteína). En el análisis comparativo entre las dos enzimas (Mslis y HEWL), los resultados se muestran como actividad relativa (expresada en %), es decir, se tomó como 100 % de la actividad a la temperatura donde las enzimas fueron mas activas (temperatura óptima).

Todos los buffers utilizados en el ensayo de pH óptimo se prepararon a una concentración de 50 mM. Se utilizaron diversos amortiguadores dependiendo del pH evaluado como se explica a continuación: acetato de sodio-ácido acético (pH de 4 a 5.5), fosfato de sodio

monobásico-dibásico (pH de 6 a 8), TrisBase-NaOH (pH de 8.5 a 9.0) y carbonato-bicarbonato de sodio (pH de 9.5 a 10). Se cuantificó la actividad de Mslis (concentración final de 18.5  $\mu$ M) a 37°C con incrementos de 0.5 unidades de pH. Los resultados se muestran como actividad relativa (expresada en %) en función del pH donde se detectó mayor actividad enzimática (100 %).

#### Secuenciación del N-terminal

La proteína fue separada mediante SDS-PAGE con un gradiente de acrilamida del 12-20%, al gel se aplicaron 2.4  $\mu$ g de Mslis. La proteína fue transferida a una membrana de Polivinidileno fluorouro (PVDF, Immobilon™) de 0.2  $\mu$ m de espesor mediante transferencia húmeda (Sambrook *et al*, 1989). La transferencia se realizó a 200 mA y voltaje constante por 105 min, el exceso de glicina se eliminó lavando la membrana 5 veces con agua grado HPLC (1 L c/u). Posteriormente, la membrana se tiñó con Azul de Coomasie R-250 al 0.1%, metanol al 40 %, ácido acético al 1 % por 1 minuto y se lavó con metanol al 50 %, se cortó la banda de interés y se almacenó a -20°C. El N-terminal de la proteína se mandó secuenciar por el método de degradación de Edman en la Universidad de California en Davis.

#### Análisis de Estructura Secundaria

La estructura secundaria de Mslis se determinó mediante espectroscopía de dicroísmo circular (CD) en el rango de UV- lejano (190-260 nm). Las mediciones se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco, Co. Reino Unido). La enzima se dializó contra agua deionizada y se filtró por una membrana de 0.22  $\mu$ m, la concentración de proteína en la celda fue de 0.0386 mg/mL. Los espectros de CD se obtuvieron a 25°C cada 0.5 nm a una velocidad de 100 nm/s. Los datos obtenidos son el promedio de tres

lecturas. Las elipticidades para cada longitud de onda fueron convertidas a unidades de  $\Delta\epsilon$  de acuerdo a la siguiente formula:

$$\Delta\epsilon = \theta \times \frac{(0.1 * MRW)}{(P * CONC) * 3298}$$

Donde:

- $\theta$ , elipticidades;
- MRW, peso molecular promedio de un aminoácido (110 );
- P, longitud del paso de luz;
- CONC, concentración de proteína en la celda;

El cálculo de estructura secundaria se realizó mediante los algoritmos SELCON3 (Sreerama y Woody, 1993) y CDSSTR (Sreerama y Woody, 2000) disponibles via internet en el servidor DICHROWEB<sup>2</sup> (Lobley *et al.*, 2002; Whitmore y Wallace, 2004). Los resultados se expresan como porcentaje de estructura secundaria. Las mediciones de los espectros de CD se realizaron en el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora.

---

<sup>2</sup> Utilice la siguiente dirección de internet para acceder al servidor DICHROWEB  
<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Purificación de Mslis

La purificación de Mslis se inició con una cromatografía de afinidad utilizando la matriz Mini leak High conjugada con *M. luteus*. En experimentos preliminares de purificación se observó la presencia de proteínas contaminantes en el extracto recombinante en las fracciones de elución. Dichas proteínas “contaminantes” fueron producto de la degradación de *M. luteus* por acción de la lisozima durante la cromatografía. Basados en esta hipótesis, se aplicó un pre-tratamiento de la matriz con HEWL para degradar las bacterias unidas a la matriz y evitar la contaminación de la muestra problema con los componentes del ligando. Se llevó a cabo una cromatografía blanco (sin aplicar muestra) y no se detectó la presencia de proteínas en el lavado ni en la elución (datos no mostrados). Por lo tanto, se consideró que la degradación y liberación del material bacteriano se había completado.

De acuerdo con lo anterior, se aplicaron 3 mg de proteína del extracto recombinante replegado y dializado contra bufer de fosfatos 50 mM pH 6.0 a la columna de afinidad. Se obtuvo una fracción (I) de proteína correspondiente al material no unido específicamente a la matriz, el cual no presentó actividad enzimática. Como muestra la figura 10, al aplicar el gradiente de NaCl se obtuvo otra fracción (II), la cual tuvo actividad de lisozima. Las muestras correspondientes se analizaron por electroforesis para verificar el grado de pureza. El análisis electroforético (SDS-PAGE) de la cromatografía mostró una banda aproximadamente a 14 kDa correspondiente al tamaño esperado para las lisozimas tipo *c* (Jolles y Jolles, 1984). Sin embargo, también se observaron otras bandas minoritarias de mayor tamaño (35-80 kDa) correspondientes a proteínas contaminantes (Figura 11, carril 2).

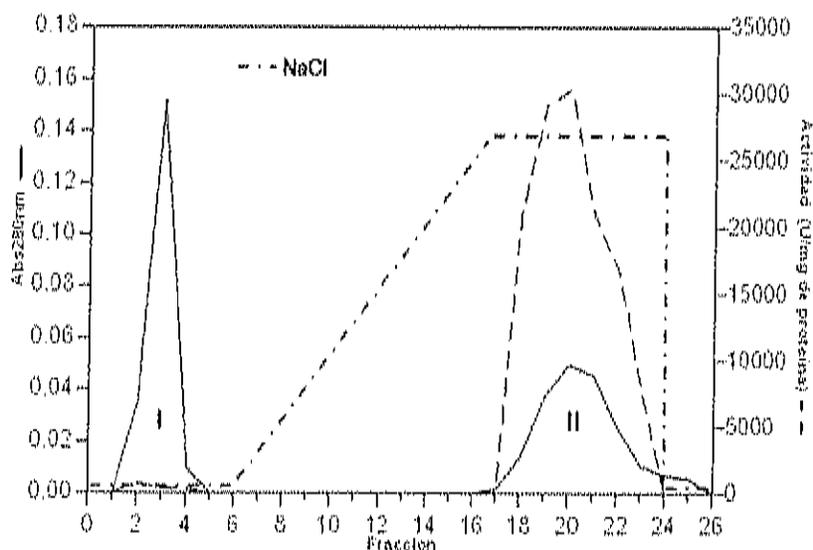


Figura 10. Cromatografía de afinidad de la lisozima recombinante de *M. sexta*. Las fracciones con actividad de lisozima se agruparon y dializaron contra bufer de fosfatos 50 mM pH 6.0. El gradiente de NaCl fue lineal de una concentración de 0 a 1 M.

Considerando estos resultados y lo discutido en el párrafo anterior, queda la interrogante de porqué la matriz posee afinidad si las bacterias han sido degradadas. De acuerdo con el mecanismo catalítico de lisozima, esta enzima requiere de 6 unidades del dímero NAG-NAM para realizar la catálisis (Phillips, 1966). Se han reportado otros oligómeros de menor tamaño (1-5) que son inhibidores competitivos de la lisozima, es decir, la enzima tiene afinidad por estos compuestos sin realizar la catálisis. De acuerdo con esto, es posible que la degradación de la pared celular del ligando no haya sido total. Por lo tanto, los fragmentos (oligómeros) de peptidoglicano unidos covalentemente a la matriz podrían estar disponibles favoreciendo la afinidad con la lisozima y la funcionalidad de la matriz. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se co-purifican otras proteínas a la par que la lisozima; por lo que son necesarios más estudios para determinar la capacidad y especificidad de esta matriz en la purificación de lisozima.

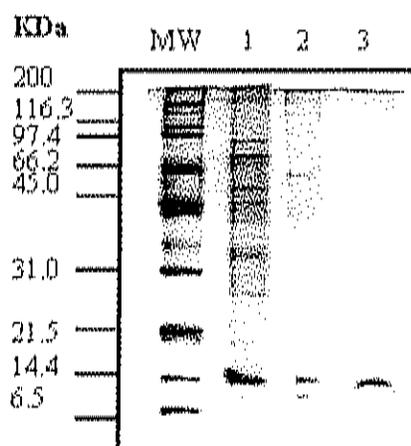


Figura 11. Electroforesis reductora y desnaturalizante de la purificación de Mslis. MW, marcador de peso molecular; 1, extracto crudo; 2, fracciones de elución de cromatografía de afinidad y 3, Mslis pura obtenida de SP-sepharose. Se aplicaron 0.5 µg de cada muestra y el gel se tiñó con plata.

Con la finalidad de eliminar las proteínas contaminantes se utilizó una cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose). Las fracciones de elución de la cromatografía de afinidad, se aplicaron a una columna de SP sepharose. Se obtuvieron dos picos de proteína, el primero (I) en el lavado sin actividad de lisozima y el segundo (II) en la elución (Figura 12). En este segundo pico fue donde se detectó actividad de lisozima y se analizó su pureza por SDS-PAGE. El resultado de la electroforesis mostró una banda única de aproximadamente 14 kDa (Figura 11, carril 3), la cual corresponde a la masa molecular deducida de la secuencia de aminoácidos (14.1 kDa) que codifica para lisozima de *M. sexta* (Mulnix y Dunn, 1994).

En la tabla 1 se muestran las etapas de purificación de la lisozima *M. sexta*. El factor de purificación de Mslis solo fue 2 veces, lo que podría indicar que durante el proceso de purificación existen pérdidas de la proteína de interés. Otra posibilidad, es que existan conformeros de Mslis con un plegamiento incorrecto. Estos conformeros "teóricos" tienen la misma masa molecular por lo que son observados en el gel de electroforesis a la misma migración, pero son eliminados por los criterios de exclusión (afinidad y carga

superficial) de las cromatografías utilizadas. Sin embargo, estos conformeros no fueron detectados por la electroforesis.

Las lisozimas tipo *c* son las más abundantes, tanto en vertebrados como invertebrados. La HEWL es la enzima estándar en la cual está basada la clasificación tipo *c* en lisozimas y tiene una masa molecular de 14,4 kDa (Jolles y Jolles, 1984). En base a esto se ha determinado que la lisozima aislada de otros insectos (polillas y moscas) pertenece al tipo *c* (Jolles *et al.*, 1979; Jain *et al.*, 2001). Además de la masa molecular, otro parámetro para determinar el tipo de lisozima es la secuencia de aminoácidos. Se ha reportado que la lisozima de insectos (orden Lepidopterae) tienen una identidad de secuencia elevada al compararla con HEWL (>30%) por lo que se han agrupado en el tipo *c* (Jain *et al.*, 2001). En la Figura 13 se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de Mslis (Muniz y Dunn, 1994) con lisozima de otros insectos y HEWL. La identidad a nivel de aminoácidos de Mslis con *A. mylitta* y *B. mori* es mayor al 80%, mientras que respecto a HEWL es de 40%. De acuerdo con el resultado reportado por Muniz y Dunn (1994) y a la aproximación de la masa molecular en SDS-PAGE, la lisozima de *M. sexta* pertenece al tipo *c*.

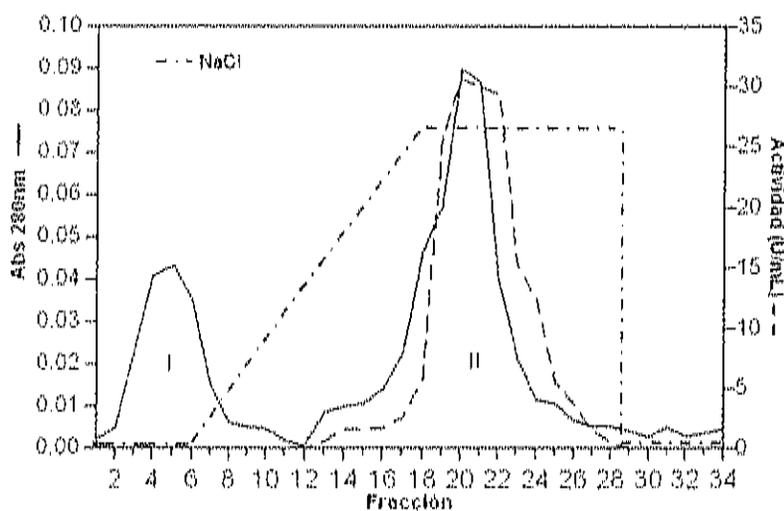


Figura 12. Cromatografía de intercambio iónico de Mslis. Las fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad se aplicaron a una columna de SP sepharose



aminoácidos del N-terminal incluyendo la inserción artificial de metionina que indica el inicio de la transcripción en el vector de expresión. La secuencia que se obtuvo es la siguiente: MKHF<sup>X</sup>SRXELVH, la X se dedujo como el aminoácido cisteína. Analizando la secuencia deducida de aminoácidos (Mulnix y Dunn, 1994) y la secuencia del N-terminal se confirma que el producto de la sobreexpresión y purificación es lisozima de *M. sexta* al ser 100% idénticos como se anticipaba. Se realizó un alineamiento del N-terminal de Mslis con otros insectos y HEWL (Figura 14). Se observa que el 50% de los aminoácidos del N-terminal son idénticos entre la secuencia estos insectos y HEWL, mientras que la identidad entre Mslis y la lisozima de los otros insectos es mayor (60%). Este resultado es consistente con la tendencia en los niveles de identidad que se observan al comparar la secuencia completa de aminoácidos de Mslis con la lisozima de otros insectos (*B. mori* y *A. myllita*) y HEWL.

Ms	KHFSRCELVH
Hv	KQFSRCGLVQ
Am	KRFTRCGLVN
Hc	KRFTRCGLVQ
Bm	KTFTRCGLVH
HEW	KVFGRC <sup>L</sup> ELAA

Figura 14. Alineamiento múltiple del N-terminal de lisozimas tipo *c* de varios insectos y HEWL. La secuencia corresponde a la proteína madura de cada especie e inicia en el aminoácido en la posición 1. Los aminoácidos conservados al menos entre 4 de las 6 especies están sombreados. Las abreviaciones y números de acceso son: Ms, *Manduca sexta*; Hv, *Heliothis virescens*, AAD00078; Am, *Anthereae myllita* HIZA; Hc, *Hyalophora cecropia* A38744; Bm, *Bombyx mori* 1GD6A; HEWL, Hen egg white 2CDSA.

## Dicroísmo Circular y Análisis de Estructura Secundaria

La espectroscopia de dicroísmo circular en el rango de UV lejano (260-180 nm) es una herramienta ampliamente utilizada en el estudio de estructura secundaria de proteínas. Una de las principales ventajas del CD es que permite la determinación de características estructurales de proteínas en solución. Además, esta técnica ha sido considerada de importancia en estudios previos a la obtención de estructuras proteicas tridimensionales mediante cristalografía de rayos-X o RMN. En este estudio se analizó el espectro de CD y se cuantificó el contenido de estructura secundaria de Mslis mediante el algoritmo SELCON 3 (Sreerama y Woody, 1993).

En la Figura 15 se muestra el espectro de dicroísmo de Mslis, se observa una elipticidad mínima a 208 nm característico de proteínas con un alto contenido de hélices- $\alpha$  (Kelly y Price, 2000). En el análisis de CD de otras lisozimas también se ha observado esta elipticidad mínima, lo cual indica la prevalencia de hélice- $\alpha$  en la estructura secundaria de esta enzima (Mulvey *et al.*, 1974; Tanaka *et al.*, 1975; Masaki *et al.*, 2001). El segundo pico mínimo característico determinado para estructura secundaria tipo hélice- $\alpha$  es a 220 nm (Kelly y Price, 2000). Sin embargo, en el espectro de CD de Mslis se observa un segundo mínimo alrededor de los 230 nm. Se ha reportado que otros factores, como los enlaces disulfuro, afectan la señal de CD a esta longitud de onda (Chaffotte *et al.*, 1992; Kelly y Price, 2000). En un estudio realizado por Masaki *et al.* (2001) hicieron una comparación entre el espectro de CD en el UV-lejano de la lisozima de *B. mori* (Bmlis) con el de HEWL. Encontraron que Bmlis tiene un pico mínimo cercano a los 230 nm similar a lo observado con Mslis y atribuyen este comportamiento a los 4 puentes disulfuro que contiene la molécula de lisozima.

En la lisozima del insecto *A. myllita*, la cual pertenece al tipo *c*, se determinó que el patrón de los puentes disulfuro corresponde con la que se observa en la HEWL (Jain *et al.*, 2001). Así mismo, los 8 residuos de cisteína que forman los cuatro puentes disulfuro

de la lisozima están conservados entre Mslis y las otras especies que se muestran en la Figura 13. Por esto, se puede hablar de que los puentes disulfuro (o conjugación de disulfuros) son muy conservados entre la lisozima de insectos y la HEWL. La Figura 16 es una representación esquemática de la secuencia primaria y de los residuos de aminoácidos que forman los puentes disulfuro en HEWL. De acuerdo con el reportado por Masaki *et al* (2001) y lo encontrado en este trabajo, el arreglo espacial de los puentes disulfuro en Mslis y Bmlis podrían ser similares entre sí pero a la vez diferentes de HEWL. Es decir, el grado de exposición de los estos enlaces podría diferir al que se observa en HEWL, de aquí que se obtenga una señal a 230 nm mas intensa que en la lisozima de otros organismos. Como se mencionó anteriormente, la Mslis es una proteína recombinante sobreexpresada en el citoplasma de *E. coli*. Por lo tanto, es prácticamente imposible que los disulfuros se formen en este medio ambiente reductor, por lo que es necesario recurrir al repliegamiento *in vitro* de la proteína. Si bien no existen reportes de proteínas o lisozimas estables con disulfuros mal formados, es necesario realizar estudios más detallados (por ejemplo cristalografía de rayos-X) en Mslis para determinar si la conformación espacial de la enzima está causando este efecto.

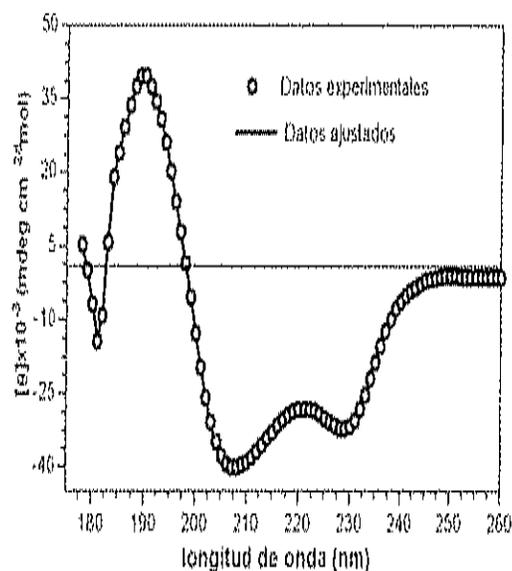


Figura 15. Espectro de CD de Mslis en el UV- lejano (178-260nm).La cantidad de enzima en la celda fue de 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y las mediciones se realizaron a 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Las lisozimas tipo *c* reportadas hasta la fecha presentan un patrón de estructura secundaria constituido principalmente por hélices- $\alpha$  (>30%) y en menor proporción  $\beta$ -plegados (<10%). Se analizaron las elipticidades molares del espectro de CD mediante el algoritmo SELCON y se encontró que el contenido de estructura secundaria de Mslis está distribuido de la siguiente manera: 57% de hélices- $\alpha$ , 2.5 % de hojas- $\beta$ , 20% de lazos y vueltas y 20.5% de estructura desordenada. De acuerdo con esto, la lisozima de este insecto parecer tener un contenido de hélices- $\alpha$  mayor que para cualquier lisozima tipo *c* de otro organismo.

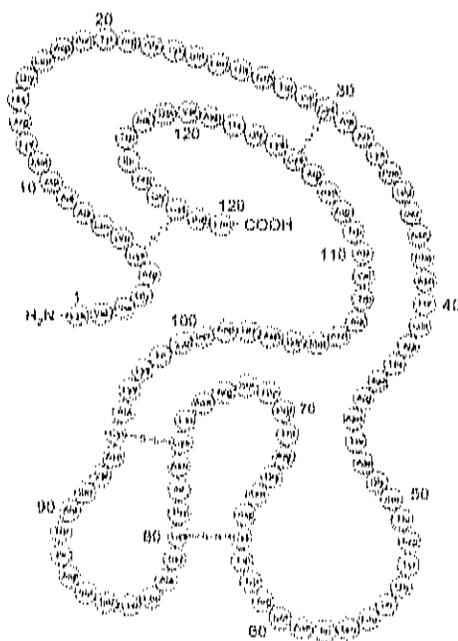


Figura 16. Puentes disulfuro en la HEWL. Se muestra enumerado un residuo de aminoácido cada 10 residuos. Los puentes disulfuro están representados por S-S-, tomado de Jaureguiadell *et al.*, (1965).

A la fecha se han obtenido las estructuras cristalográficas de lisozima de dos insectos y a partir de estos estudios se ha determinado su contenido de estructura secundaria. El gusano de seda (*B. mori*) tiene 32.7% de hélices- $\alpha$  y 3.1% de hojas- $\beta$  (Matsuura *et al.*, 2002); así mismo, el gusano de seda-Tassar (*Anthereae myllita*) tiene un contenido similar de hélices- $\alpha$  (34,2%) respecto a *B. mori*, y un 6.7% de hojas- $\beta$  (Jain *et al.*, 2001). Aunque estos números están basados en la estructura cristalográfica, se ha reportado que no existe una variación drástica respecto a los valores obtenidos en solución. Por ejemplo, Masaki *et al* (2001), mediante CD en el UV-lejano determinaron que el contenido de hélices- $\alpha$  de Bmlis en solución es del 34.0 %. Por lo que, si comparamos este resultado con el obtenido por cristalografía de rayos-X por Matsuura *et al* (2002), ambos resultados difieren en solo 1.3 % en el contenido de este elemento estructural.

De acuerdo con el contenido de estructura secundaria obtenido por CD, la Mslis al igual que la lisozima de otros organismos, se clasifica como una proteína constituida principalmente por hélices- $\alpha$  (Orengo *et al.*, 1997). Es decir, la Mslis tiene un plegamiento estructural conservado de lisozima. Sin embargo, el contenido de hélices- $\alpha$  de Mslis es mucho mayor (57%) que cualquier otra lisozima tipo-*c*. En base a estas observaciones se pueden establecer dos hipótesis al respecto.

La primera hipótesis es que el mayor contenido de hélices- $\alpha$  puede deberse a un problema del proceso de replegamiento. Se ha observado que durante las primeras etapas del replegamiento los principales tipo de estructuras que se forma son hélices- $\alpha$  (Radford *et al.*, 1992; Hooke *et al.*, 1994), por lo tanto, es probable que las moléculas de lisozima hayan logrado el equilibrio en este estadio. Sin embargo, a la fecha no se encontraron reportes en los que se haya observado este fenómeno. Basado en la estructura de otras lisozimas tipo *c* y al alto grado de identidad de la secuencia aminoacídica (40 y 80%) con otras lisozimas tipo *c*, teóricamente, el contenido de estructura secundaria observado en Mslis no sería la conformación nativa de esta molécula. Si se considera que este plegamiento de estructura secundaria no fuese el nativo, entonces ¿porqué esta molécula

A la fecha se han obtenido las estructuras cristalográficas de lisozima de dos insectos y a partir de estos estudios se ha determinado su contenido de estructura secundaria. El gusano de seda (*B. mori*) tiene 32.7% de hélices- $\alpha$  y 3.1% de hojas- $\beta$  (Matsuura *et al.*, 2002); así mismo, el gusano de seda-Tassar (*Anthereae myllita*) tiene un contenido similar de hélices- $\alpha$  (34.2%) respecto a *B. mori*, y un 6.7% de hojas- $\beta$  (Jain *et al.*, 2001). Aunque estos números están basados en la estructura cristalográfica, se ha reportado que no existe una variación drástica respecto a los valores obtenidos en solución. Por ejemplo, Masaki *et al* (2001), mediante CD en el UV-lejano determinaron que el contenido de hélices- $\alpha$  de Bmlis en solución es del 34.0 %. Por lo que, si comparamos este resultado con el obtenido por cristalografía de rayos-X por Matsuura *et al* (2002), ambos resultados difieren en solo 1.3 % en el contenido de este elemento estructural.

De acuerdo con el contenido de estructura secundaria obtenido por CD, la Mslis al igual que la lisozima de otros organismos, se clasifica como una proteína constituida principalmente por hélices- $\alpha$ . (Orengo *et al.*, 1997). Es decir, la Mslis tiene un plegamiento estructural conservado de lisozima. Sin embargo, el contenido de hélices- $\alpha$  de Mslis es mucho mayor (57%) que cualquier otra lisozima tipo-c. En base a estas observaciones se pueden establecer dos hipótesis al respecto.

La primera hipótesis es que el mayor contenido de hélices- $\alpha$  puede deberse a un problema del proceso de replegamiento. Se ha observado que durante las primeras etapas del replegamiento los principales tipo de estructuras que se forma son hélices- $\alpha$  (Radford *et al.*, 1992; Hooke *et al.*, 1994), por lo tanto, es probable que las moléculas de lisozima hayan logrado el equilibrio en este estadio. Sin embargo, a la fecha no se encontraron reportes en los que se haya observado este fenómeno. Basado en la estructura de otras lisozimas tipo c y al alto grado de identidad de la secuencia aminoacídica (40 y 80%) con otras lisozimas tipo c, teóricamente, el contenido de estructura secundaria observado en Mslis no sería la conformación nativa de esta molécula. Si se considera que este plegamiento de estructura secundaria no fuese el nativo, entonces ¿porqué esta molécula

tiene actividad de lisozima?. Es decir, estamos hablando de una molécula con una secuencia de aminoácidos muy conservada de lisozima, con actividad típica de lisozima y con contenido de hélices- $\alpha$  conservado pero a la vez diferente (57% Mslis vs 30% otras tipo *c*).

A la fecha, son muchos los trabajos en los que por la poca abundancia de material nativo, o por indisponibilidad de los organismos se ha recurrido a herramientas recombinantes para obtener la proteína de interés (Wilquet *et al.*, 1998; Tahar *et al.*, 2001). Así mismo, otros trabajos han recurrido a estas herramientas con previo conocimiento de la proteína nativa y no han reportado ambigüedades del producto recombinante respecto al nativo (Sirawaraporn *et al.*, 1993). Se ha caracterizado a detalle el gen que codifica para Mslis y algunas características inmuno-estimulantes de la proteína (Rosenthal y Dahlman, 1991; Mulnix y Dunn, 1994), sin embargo, no se tiene conocimiento alguno de las propiedades estructurales o bioquímicas del producto del gene.

La segunda hipótesis a considerar sería que el contenido de estructura secundaria encontrado por CD de Mslis es idéntico al que posee la proteína nativa. Entonces, estaríamos discutiendo respecto a una lisozima tipo *c* (activa) pero con un contenido de estructura secundaria que excede lo reportado para otros organismos. Si cualquiera de estas dos hipótesis planteadas fuese cierta, sería de gran importancia continuar con la caracterización de Mslis, para generar información que permitiría un mejor entendimiento respecto al dogma de la relación secuencia-estructura-función de las proteínas.

### Actividad lítica en función de la Temperatura y pH

Con el propósito de determinar el pH óptimo de Mslis, se evaluó la actividad catalítica de la enzima en un rango de pH desde 4 a 10. El pH es uno de los parámetros físicoquímicos que está directamente relacionado con la actividad de una enzima. En la mayoría de las enzimas, el residuo o los residuos catalíticos, son amino ácidos cargados y por lo tanto, el estado de ionización que mantengan es muy importante en su función. Así mismo, las interacciones electrostáticas involucradas en la estabilización de la proteína están directamente relacionadas con el estado de ionización de las cadenas laterales de los aminoácidos.

El pH óptimo de hidrólisis de *M. luteus* por Mslis determinado a 37°C fue 6.5 (Figura 17). En la misma figura se observa que la actividad relativa a pH 8.0 fue de 20%, seguido de un aumento de la actividad hasta alcanzar niveles de 70% (pH 8.5). A pH igual o mayor a 9.5 la actividad de Mslis es prácticamente nula. Está bien documentado que las lisozimas -tipo *c*- de vertebrados tienen un pH óptimo ligeramente ácido ( $\approx 6.0$ ) (Davies *et al.*, 1969; Jolles y Jolles, 1984). Así mismo, se ha determinado el perfil de actividad enzimática en función de pH de la lisozima de algunos insectos como *B. mori*, *G. melallonela* (Powning y Davidson, 1973), *H. cunea* (Park *et al.*, 1997) y *Samia cynthia ricino* (Fujimoto *et al.*, 2001). Estas enzimas muestran un rango de pH óptimo ligeramente ácido (6.0-6.5) que coincide con el de otras lisozimas tipo-*c*. Cabe mencionar que no todas las lisozimas de insecto tienen un pH óptimo en este rango. Un caso excepcional es la lisozima de *Musca domestica*, cuyo pH óptimo es más ácido (5.0). Sin embargo, este comportamiento se ha relacionado con posibles funciones digestivas de la enzima en dicho insecto (Ito *et al.*, 1995). Por lo tanto, nuestro resultado es consistente con el rango de pH óptimo observado para la lisozima en otros organismos.

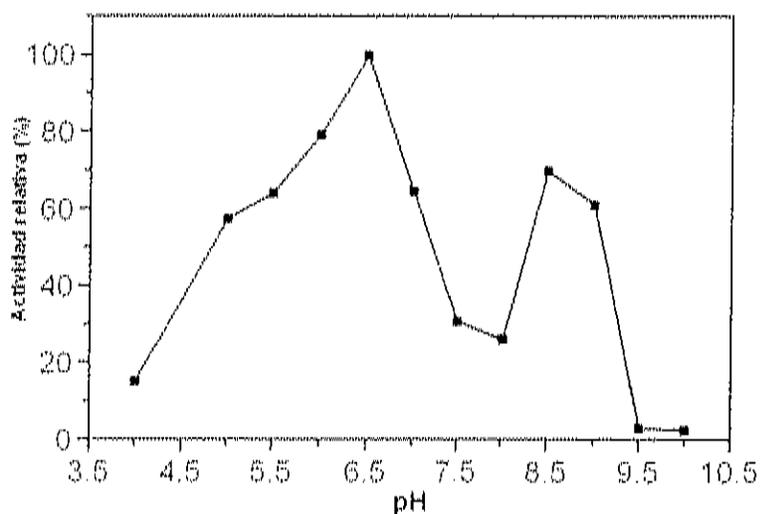


Figura 17. Actividad enzimática de Mslis en función del pH a 37°C. Se tomó como 100% el pH donde se detectó mayor actividad enzimática.

Es bien conocido que la lisozima, en particular las tipo *c*, conserva la actividad enzimática a temperaturas elevadas (Jolles y Jolles, 1984). Se encontró que la actividad enzimática aumentó lentamente de los 5 a los 35°C, seguido de una disminución drástica al alcanzar los 45°C. Por lo tanto, la temperatura óptima de Mslis es 35°C (Figura 18). Con la finalidad de comparar este resultado se determinó, bajo las mismas condiciones, la temperatura óptima de HEWL. Se encontró que la Mslis tiene una temperatura óptima 10°C menor que HEWL. En invertebrados marinos se ha reportado temperatura óptima de actividad similar a lo encontrado con Mslis. La lisozima de ostión (*Crassostrea virginica*) pertenece al tipo *i* y se reportó su actividad máxima fue de 40°C (Xue *et al.*, 2004). En otros invertebrados como los insectos, se han realizado estudios mas detallados acerca de la dependencia de la actividad enzimática en función de la temperatura. En *B. mori* se reportó que la actividad óptima de la enzima (55°C) es 10°C mas baja que su homóloga en clara de huevo de gallina (HEWL) (Matsuura *et al.*, 2002). En ese mismo estudio, se observó un comportamiento similar a lo observado con Mslis, es decir, una aparente mayor actividad catalítica a bajas temperaturas.

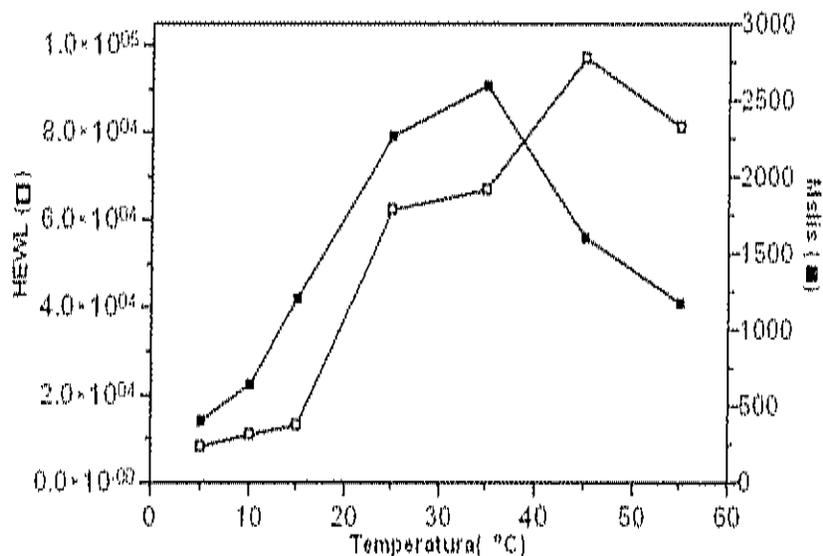


Figura 18. Temperatura óptima de Mslis y HEWL a pH 6.0. La actividad enzimática se expresa como unidades de actividad específica (U/mg de proteína).

En base a lo anterior, se analizó la gráfica de temperatura óptima de Mslis y HEWL expresando los resultados como actividad relativa (%) (Figura 19). En esta gráfica se observa que la actividad de Mslis aumenta rápidamente, mientras que la actividad de HEWL se mantiene prácticamente constante a temperaturas entre 5 y 15°C. Esta figura muestra que la actividad relativa de Mslis y HEWL a 15°C es 46 y 13%, respectivamente. Analizando a detalle esta parte de la gráfica, se observó que la actividad catalítica de Mslis es de 2 a 3 veces mayor que HEWL en este intervalo de temperatura. Grinde, *et al* (1998), reportaron que la lisozima de trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) tiene actividad catalítica elevada a bajas temperaturas, por lo que se consideró que tiene características similares a las enzimas psicrófilas (Grinde *et al.*, 1988). Recientemente, Matsuura *et al* (2002), encontraron que Bmlis conserva mayor actividad catalítica (4-6 veces) que HEWL en el mismo rango de temperatura que se mencionó para Mslis. Con estudios más detallados de estabilidad y flexibilidad estructural, estos autores concluyeron que Bmlis

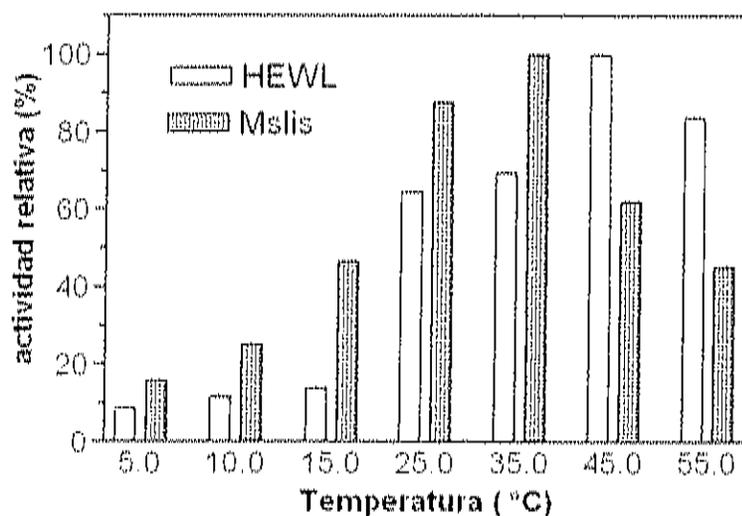


Figura 19. Actividad relativa en función de la temperatura de Mslis y HEWL. Se tomó como 100% la temperatura a la que se detectó mayor actividad.

tiene características similares a las enzimas adaptadas al frío (Matsuura *et al.*, 2002).

De manera general, se considera que la lisozima tiene una actividad catalítica óptima a temperaturas elevadas (>45°C). Sin embargo, se han reportado algunas lisozimas tipo c que presentan buena eficiencia catalítica a bajas temperaturas, principalmente de organismos que habitan de climas templados a fríos (peces). No obstante, se ha documentado que la lisozima de insectos (*B. mori*) tiene características similares a las enzimas psicrófilas. Por lo tanto, es probable que Mslis también pueda catalogarse con características similares a estas enzimas adaptadas al frío, esto por el comportamiento catalítico observado a bajas temperaturas (Figura 19). Cabe mencionar que son necesarios más estudios en Mslis (por ejemplo, flexibilidad estructural, estabilidad térmica, etc.) para concluir si efectivamente esta enzima presenta adaptación para realizar catálisis a bajas temperaturas.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente trabajo se logró la purificación de Mslis mediante cromatografía de afinidad a *Micrococcus luteus* a partir de un extracto proveniente de sobreexpresión recombinante en *Escherichia coli* y plegamiento *in vitro*. Como parte de la caracterización biofísica se encontró que el contenido de estructura secundaria de esta enzima es consistente (principalmente hélices- $\alpha$ ) con lo reportado para otras lisozimas tipo *c*. Sin embargo, el contenido de hélices- $\alpha$  (57%) es mayor (dos veces) que para cualquier lisozima tipo *c*.

En lo que respecta a las propiedades catalíticas de la enzima, se encontró que el pH y la temperatura óptima(o) coincide con lo reportado para otras tipo *c* de invertebrados (insectos). La actividad catalítica de Mslis a bajas temperaturas es similar a lo reportado para Bmlis, en base a esto, la Mslis podría tener ciertas propiedades (alta flexibilidad, baja estabilidad estructural) específicas de las enzimas adaptadas al frío (*cold-adapted*). De acuerdo a la literatura citada en esta investigación y a las propiedades catalíticas de Mslis, la lisozima de este insecto tiene características particulares que difieren de sus homologas en vertebrados.

Por último, son necesarios más estudios en esta enzima para explicar las diferencias conformacionales encontradas y determinar si estas tienen alguna relación con el comportamiento catalítico observado. Así mismo, se recomienda investigar a detalle las características de la lisozima nativa de *M. sexta* para realizar un estudio comparativo entre la enzima recombinante y la nativa. Esto último sería de mucha importancia para discernir si el plegamiento de Mslis es similar al nativo o es un conformero producto de replegamiento con actividad de muramidasa.

## REFERENCIAS

- Adler, A. J., Greenfield, N. J. y Fasman, G. D. (1973). "Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides." *Methods Enzymol* **27**: 675-735.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." *Science* **181**(96): 223-30.
- Anfinsen, C. B., Redfield, R. R., Choate, W. L., Page, J. y Carroll, W. R. (1954). "Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease." *J Biol Chem* **207**(1): 201-10.
- Armstrong, N., de Lencastre, A. y Gouaux, E. (1999). "A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase." *Protein Sci* **8**(7): 1475-83.
- Arnheim, N., Inouye, M., Law, L. y Laudin, A. (1973). "Chemical studies on the enzymatic specificity of goose egg white lysozyme." *J Biol Chem* **248**(1): 233-6.
- Barillas-Mury, C., Wizel, B. y Han, Y. S. (2000). "Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development." *Insect Biochem Mol Biol* **30**(6): 429-42.
- Beadle, B. M. y Shoichet, B. K. (2002). "Structural bases of stability-function tradeoffs in enzymes." *J Mol Biol* **321**(2): 285-96.
- Bernier, L., Van Leemputten, E., Horisberger, M., Bush, D. A. y Jolles, P. (1971). "The turnip lysozyme." *FEBS Lett* **14**(2): 100-104.
- Blake, C. C., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C. y Sarma, V. R. (1967). "Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **167**(9): 378-88.
- Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C. y Sarma, V. R. (1965). "Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution." *Nature* **206**(986): 757-61.
- Blake, C. C., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C. y Sarma, V. R. (1967). "On the conformation of the hen egg-white lysozyme molecule." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **167**(9): 365-77.
- Boman, H. G., Faye, I., von Hofsten, P., Kockum, K., Lee, J. Y., Xanthopoulos, K. G., Bennich, H., Engstrom, A., Merrifield, R. B. y Andreu, D. (1985). "On the primary structures of lysozyme, cecropins and attacins from *Hyalophora cecropia*." *Dev Comp Immunol* **9**(3): 551-8.
- Bond, C. J., Wong, K. B., Clarke, J., Fersht, A. R. y Daggett, V. (1997). "Characterization of residual structure in the thermally denatured state of barnase by simulation and experiment: description of the folding pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13409-13.
- Borgstahl, G. E., Pokross, M., Chehab, R., Sekher, A. y Snell, E. H. (2000). "Cryo-trapping the six-coordinate, distorted-octahedral active site of manganese superoxide dismutase." *J Mol Biol* **296**(4): 951-9.

- Buswell, A. M. y Middelberg, A. P. J. (2003). "A new kinetic scheme for lysozyme refolding and aggregation." *Biotechnol Bioeng* **83**(5): 567-577.
- Calderon-Arredondo, S. A. (2003). "Sobreexpresión, replegamiento y aislamiento de la lisozima de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en bacterias *Escherichia coli*". Tesis de Licenciatura. ITLM, Los Mochis, Sin.
- Cameron, C. E. y Benkovic, S. J. (1997). "Evidence for a functional role of the dynamics of glycine-121 of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase obtained from kinetic analysis of a site-directed mutant." *Biochemistry* **36**(50): 15792-800.
- Canfield, R. E. (1963). "The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme." *J Biol Chem* **238**: 2698-707.
- Chaffotte, A. F., Guillou, Y. y Goldberg, M. E. (1992). "Kinetic resolution of peptide bond and side chain far-UV circular dichroism during the folding of hen egg white lysozyme." *Biochemistry* **31**(40): 9694-702.
- Chung, K. T. y Ourth, D. D. (2000). "Larval and pupal induction and N-terminal amino acid sequence of lysozyme from *Heliothis virescens*." *J Insect Physiol* **46**(4): 563-572.
- Clark, E. D. B. (1998). "Refolding of recombinant proteins." *Curr Opin Biotechnol* **9**(2): 157-63.
- Collins, T., Meuwis, M. A., Gerday, C. y Feller, G. (2003). "Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments." *J Mol Biol* **328**(2): 419-28.
- Davies, R. C., Neuberger, A. y Wilson, B. M. (1969). "The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength." *Biochim Biophys Acta* **178**(2): 294-305.
- Dianoux, A. C. y Jolles, P. (1967). "Study of a lysozyme poor in cystine and tryptophan: the lysozyme of goose egg white." *Biochim Biophys Acta* **133**(3): 472-9.
- Dill, K. A. (1990). "Dominant forces in protein folding." *Biochemistry* **29**(31): 7133-55.
- Dobson, D. E., Prager, E. M. y Wilson, A. C. (1984). "Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties." *J Biol Chem* **259**(18): 11607-16.
- Fersht, A. (1999). Folding pathways and energy Landscapes. Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding. M. Russel. New York, Freeman, W.H. and Company: 573-575.
- Fersht, A. (1999). Methods for determination of three-dimensional structure. Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding. M. Russel. New York, Freeman, W.H. and Company: 4-7.
- Ffrench-Constant, R. H., Daborn, P. J. y Le Goff, G. (2004). "The genetics and genomics of insecticide resistance." *Trends Genet* **20**(3): 163-70.
- Fields, P. A. (2001). "Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**(2-3): 417-31.
- Fujimoto, S., Toshimori-Tsuda, I., Kishimoto, K., Yamano, Y. y Morishima, I. (2001). "Protein purification, cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **128**(4): 709-18.

- Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J. C., Sonan, G., Feller, G. y Gerday, C. (2004). "Some like it cold: biocatalysis at low temperatures." *FEMS Microbiol Rev* **28**(1): 25-42.
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R. y Tenczek, T. (1997). "Biological mediators of insect immunity." *Annu Rev Entomol* **42**: 611-43.
- Gordon, S., Todd, J. y Cohn, Z. A. (1974). "In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes." *J Exp Med* **139**(5): 1228-48.
- Grabarek, Z., Drabikowski, W., Leavis, P. C., Rosenfeld, S. S. y Gergely, J. (1981). "Proteolytic fragments of troponin C. Interactions with the other troponin subunits and biological activity." *J Biol Chem* **256**(24): 13121-7.
- Grinde, B., Jolles, J. y Jolles, P. (1988). "Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." *Eur J Biochem* **173**(2): 269-73.
- Hammes, G. G. (2002). "Multiple conformational changes in enzyme catalysis." *Biochemistry* **41**(26): 8221-8.
- Handler, A. M. (2001). "A current perspective on insect gene transformation." *Insect Biochem Mol Biol* **31**(2): 111-28.
- Hankiewicz, J. y Swierczek, E. (1974). "Lysozyme in human body fluids." *Clin Chim Acta* **57**(3): 205-9.
- Hennessey, J. P., Jr. y Johnson, W. C., Jr. (1981). "Information content in the circular dichroism of proteins." *Biochemistry* **20**(5): 1085-94.
- Herzberg, O., Moul, J. y James, M. N. (1986). "A model for the Ca<sup>2+</sup>-induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction." *J Biol Chem* **261**(6): 2638-44.
- Hooke, S. D., Radford, S. E. y Dobson, C. M. (1994). "The refolding of human lysozyme: a comparison with the structurally homologous hen lysozyme." *Biochemistry* **33**(19): 5867-76.
- Hough, M. A. y Hasnain, S. S. (1999). "Crystallographic structures of bovine copper-zinc superoxide dismutase reveal asymmetry in two subunits: functionally important three and five coordinate copper sites captured in the same crystal." *J Mol Biol* **287**(3): 579-92.
- Howard, J. B. y Glazer, A. N. (1969). "Papaya lysozyme. Terminal sequences and enzymatic properties." *J Biol Chem* **244**(6): 1399-409.
- Hulmark, D. (1993). "Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity." *Trends Genet* **9**(5): 178-83.
- Inouye, M., Imada, M. y Tsugita, A. (1970). "The amino acid sequence of T4 phage lysozyme. IV. Dilute acid hydrolysis and the order of tryptic peptides." *J Biol Chem* **245**(14): 3479-84.
- Ito, Y., Nakamura, M., Hotani, T. y Imoto, T. (1995). "Insect lysozyme from house fly (*Musca domestica*) larvae: possible digestive function based on sequence and enzymatic properties." *J Biochem (Tokyo)* **118**(3): 546-51.
- Itzhaki, L. S., Evans, P. A., Dobson, C. M. y Radford, S. E. (1994). "Tertiary interactions in the folding pathway of hen lysozyme: kinetic studies using fluorescent probes." *Biochemistry* **33**(17): 5212-20.

- Jain, D., Nair, D. T., Swaminathan, G. J., Abraham, E. G., Nagaraju, J. y Salunke, D. M. (2001). "Structure of the induced antibacterial protein from tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. Implications to molecular evolution." *J Biol Chem* **276**(44): 41377-82.
- Jaureguiadell, J., Jolles, J. y Jolles, P. (1965). "The disulfide bridges of hen's egg-white lysozyme." *Biochim Biophys Acta* **107**(1): 97-111.
- Jencks, W. P. (1987). *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. New York, Dover Publications, Inc.
- Jolles, J., Schoentgen, F., Croizier, G., Croizier, L. y Jolles, P. (1979). "Insect lysozymes from three species of Lepidoptera: their structural relatedness to the C (chicken) type lysozyme." *J Mol Evol* **14**(4): 267-71.
- Jolles, P. y Jolles, J. (1984). "What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday." *Mol Cell Biochem* **63**(2): 165-89.
- Kelly, S. M. y Price, N. C. (1997). "The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding." *Biochim Biophys Acta* **1338**(2): 161-85.
- Kelly, S. M. y Price, N. C. (2000). "The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function." *Curr Protein Pept Sci* **1**(4): 349-84.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Law, J. H., Ribeiro, J. M. y Wells, M. A. (1992). "Biochemical insights derived from insect diversity." *Annu Rev Biochem* **61**: 87-111.
- Law, J. H. y Wells, M. A. (1989). "Insects as biochemical models." *J Biol Chem* **264**(28): 16335-8.
- Lilie, H., Schwarz, E. y Rudolph, R. (1998). "Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*." *Curr Opin Biotechnol* **9**(5): 497-501.
- Lobley, A., Whitmore, L. y Wallace, B. A. (2002). "DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra." *Bioinformatics* **18**(1): 211-2.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-75.
- Masaki, K., Aizawa, T., Koganesawa, N., Nimori, T., Bando, H., Kawano, K. y Nitta, K. (2001). "Thermal stability and enzymatic activity of a smaller lysozyme from silk moth (*Bombyx mori*)." *J Protein Chem* **20**(2): 107-13.
- Mathews, C. K. y Van-Holde, K.E., Ed. (2000). *Biochemistry*. Aravaca, MacGraw-Hill/interamericana.
- Matsumura, I. y Kirsch, J. F. (1996). "Is aspartate 52 essential for catalysis by chicken egg white lysozyme? The role of natural substrate-assisted hydrolysis." *Biochemistry* **35**(6): 1881-9.
- Matsuura, A., Yao, M., Aizawa, T., Koganesawa, N., Masaki, K., Miyazawa, M., Demura, M., Tanaka, I., Kawano, K. y Nitta, K. (2002). "Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures." *Biochemistry* **41**(40): 12086-92.

- Matthews, B. W., Grutter, M. G., Anderson, W. F. y Remington, S. J. (1981). "Common precursor of lysozymes of hen egg-white and bacteriophage T4." *Nature* **290**(5804): 334-5.
- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A. y Ebert, M. H. (1981). "Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins." *Science* **211**(4489): 1437-8.
- Mirsky, A. E. y Pauling, L. (1936). "ON the structure of nativee, Denatured, and Coagulated Proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **22**(7): 439-447.
- Mulnix, A. B. y Dunn, P. E. (1994). "Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*." *Insect Biochem Mol Biol* **24**(3): 271-81.
- Mulvey, R. S., Gualtieri, R. J. y Beychok, S. (1974). "Composition, fluorescence, and circular dichroism of rat lysozyme." *Biochemistry* **13**(4): 782-7.
- Murray, A. C. y Kay, C. M. (1972). "Hydrodynamic and optical properties of troponin A. Demonstration of a conformational change upon binding calcium ion." *Biochemistry* **11**(14): 2622-7.
- Nunziante, M., Gilch, S. y Schatzl, H. M. (2003). "Prion diseases: from molecular biology to intervention strategies." *Chembiochem* **4**(12): 1268-84.
- Orengo, C. A., Michie, A. D., Jones, S., Jones, D. T., Swindells, M. B. y Thornton, J. M. (1997). "CATH a hierarchic classification of protein domain structures." *Structure* **5**(8): 1093-108.
- Osserman, E. F., Klockars, M., Halper, J. y Fischel, R. E. (1973). "Effects of lysozyme on normal and transformed mammalian cells." *Nature* **243**(5406): 331-5.
- Park, H. Y., Park, S. S., Shin, S. W., Park, D. S., Kim, M. G., Oh, H. W. y Joo, C. K. (1997). "Protein purification and nucleotide sequence of a lysozyme from the bacteria-induced larvae of the fall webworm, *Hyphantria cunea*." *Arch Insect Biochem Physiol* **35**(3): 335-45.
- Patel, N. H. (1994). "Developmental evolution: insights from studies of insect segmentation." *Science* **266**(5185): 581-90.
- Pauling, L. y Corey, R. B. (1951). "Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptide chains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **37**(5): 235-40.
- Pauling, L. y Corey, R. B. (1951). "The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **37**(5): 251-6.
- Pauling, L. y Corey, R. B. (1951). "The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group." *Proc Natl Acad Sci U S A* **37**(5): 272-81.
- Pauling, L., Corey, R. B. y Branson, H. R. (1951). "The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **37**(4): 205-11.
- Phillips, D. C. (1966). "The three-dimensional structure of an enzyme molecule." *Sci Am* **215**(5): 78-90.
- Powning, R. F. y Davidson, W. J. (1973). "Studies on insect bacteriolytic enzymes. I. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*." *Comp Biochem Physiol B* **45**(3): 669-86.

- Radford, S. E., Dobson, C. M. y Evans, P. A. (1992). "The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways." *Nature* **358**(6384): 302-7.
- Regel, R., Matioli, S. R. y Terra, W. R. (1998). "Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function." *Insect Biochem Mol Biol* **28**(5-6): 309-19.
- Rodger, A. y L, M.A. (2000). Introduction to circular dichroism, Spectrophotometry and Spectrofluorimetry. M. G. Gore, Oxford, Oxford University press: 99-139.
- Rosenthal, G. A. y Dahlman, D. L. (1991). "Studies of L-canavanine incorporation into insectan lysozyme." *J Biol Chem* **266**(24): 15684-7.
- Rupley, J. A. (1967). "The binding and cleavage by lysozyme of N-acetylglucosamine oligosaccharides." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **167**(9): 416-28.
- Sawaya, M. R. y Kraut, J. (1997). "Loop and subdomain movements in the mechanism of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: crystallographic evidence." *Biochemistry* **36**(3): 586-603.
- Sharon, N. (1967). "The chemical structure of lysozyme substrates and their cleavage by the enzyme." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **167**(9): 402-15.
- Shugar, D. (1952). "The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme." *Biochim Biophys Acta* **8**(3): 302-9.
- Sirawaraporn, W., Prapunwattana, P., Sirawaraporn, R., Yuthavong, Y. y Santi, D. V. (1993). "The dihydrofolate reductase domain of *Plasmodium falciparum* thymidylate synthase-dihydrofolate reductase. Gene synthesis, expression, and anti-folate-resistant mutants." *J Biol Chem* **268**(29): 21637-44.
- 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): 76-85.
- Sreerama, N. y Woody, R. W. (1993). "A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism." *Anal Biochem* **209**(1): 32-44.
- Sreerama, N. y Woody, R. W. (2000). "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set." *Anal Biochem* **287**(2): 252-60.
- Sun, S. C., Asling, B. y Faye, I. (1991). "Organization and expression of the immunoresponsive lysozyme gene in the giant silk moth, *Hyalophora cecropia*." *J Biol Chem* **266**(10): 6644-9.
- Tahar, R., de Pecoulas, P. E., Basco, L. K., Chiadmi, M. y Mazabraud, A. (2001). "Kinetic properties of dihydrofolate reductase from wild-type and mutant *Plasmodium vivax* expressed in *Escherichia coli*." *Mol Biochem Parasitol* **113**(2): 241-9.
- Tanaka, F., Forster, L. S., Pal, P. K. y Rupley, J. A. (1975). "The circular dichroism of lysozyme." *J Biol Chem* **250**(17): 6977-82.
- Tsou, C. L. (1998). "The role of active site flexibility in enzyme catalysis." *Biochemistry (Mosc)* **63**(3): 253-8.

- Villaverde, A. y Carrio, M. M. (2003). "Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies." *Biotechnol Lett* **25**(17): 1385-95.
- Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R. y Withers, S. G. (2001). "Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate." *Nature* **412**(6849): 835-8.
- Whitmore, L. y Wallace, B. A. (2004). "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data." *Nucleic Acids Res* **32**(Web Server issue): W668-73.
- Wilquet, V., Gaspar, J. A., van de Lande, M., Van de Casteele, M., Legrain, C., Meiering, E. M. y Glansdorff, N. (1998). "Purification and characterization of recombinant *Thermotoga maritima* dihydrofolate reductase." *Eur J Biochem* **255**(3): 628-37.
- Woody, R. W. (1995). "Circular dichroism." *Methods Enzymol* **246**: 34-71.
- Woody, R. W. (2004). "Circular dichroism of protein-folding intermediates." *Methods Enzymol* **380**: 242-85.
- Wuthrich, K. (1990). "Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy." *J Biol Chem* **265**(36): 22059-62.
- Xue, Q. G., Schey, K. L., Volety, A. K., Chu, F. L. y La Peyre, J. F. (2004). "Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*)." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **139**(1): 11-25.
- Yamasaki, K., Ogasahara, K., Yutani, K., Oobatake, M. y Kanaya, S. (1995). "Folding pathway of *Escherichia coli* ribonuclease HI: a circular dichroism, fluorescence, and NMR study." *Biochemistry* **34**(51): 16552-62.
- Yu, K. H., Kim, K. N., Lee, J. H., Lee, H. S., Kim, S. H., Cho, K. Y., Nam, M. H. y Lee, I. H. (2002). "Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*." *Dev Comp Immunol* **26**(8): 707-13.
- Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor y Petsko, G. A. (1998). "Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7406-11.



## APÉNDICE

### Artículo 1.

**López-Zavala, A.A.**, de-la-Re-Vega, E., Calderón-Arredondo, S.A., García-Orozco K.D., Velázquez-Contreras, E., Islas-Osuna, M.A, Valdez, M.A. and R.R. Sotelo-Mundo (2004). Biophysical Characterization Of An Insect Lysozyme From *Manduca sexta*. *Protein and Peptide Letters* **11**(1)85-92.

### Artículo 2.

Karina D. García-Orozco, **Alonso A. López-Zavala**, Daniel Puentes-Camacho, Ana Maria Calderón-de-la-Barca and Rogerio R. Sotelo-Mundo (2005). Recombinant bacterial expression, refolding and affinity purification of the C-lysozyme from the tobacco-hornworm *Manduca sexta*. En revisión en "Biotechnology Letters".

## BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION OF AN INSECT LYSOZYME FROM *Manduca sexta*

Afonso A. López-Zavala<sup>1#</sup>, Enrique de-la-Re-Vega<sup>1,5</sup>, Sergio A. Calderón-Arredondo<sup>1</sup>,  
Karina D. García-Orozeo<sup>1</sup>, Enrique F. Velázquez<sup>3</sup>, María A. Islas-Osuna<sup>2</sup>,  
Miguel A. Valdez<sup>3,4</sup> and Rogerio R. Sotelo-Mundo<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Aquatic Molecular Biology; <sup>2</sup>Plant Molecular Biology and Graduate Program in Sciences\*,  
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. P.O. Box 1735, Hermosillo Sonora 83000  
México,

<sup>3</sup>Polymer and Materials Department; <sup>4</sup>Physics Department; and <sup>5</sup>Aquaculture Graduate Program,  
Universidad de Sonora, Rosales y Blvd. Transversal, Hermosillo Sonora 83000 México

\*Corresponding author: (rs@cascabel.ciad.mx)

**Abstract:** Insect lysozyme from *Manduca sexta* (MS-lys) was overexpressed in *E. coli* and refolded to obtain active protein. Recombinant MS-lys presented a globular structure, with an alpha-helical content of 57% as assessed by circular dichroism spectroscopy. Light scattering studies showed that in solution MS-lys has a quasi-monodisperse size distribution, with a rod-like structure similar to nucleation clusters reported in egg lysozyme pre-crystallization stages. These results show that MS-lys is an excellent candidate for crystallization, folding and denaturation studies.

**Key Words:** Lysozyme, insect, *Manduca sexta*, circular dichroism, dynamic light scattering, secondary structure

### INTRODUCTION

Lysozyme (EC 3.2.1.7) is an ubiquitous enzyme that catalyzes the hydrolysis of the  $\beta$ -1,4 glycosidic bond between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine in cell wall peptidoglycans of Gram-positive bacteria [1]. This enzyme mediates the immune response against bacterial infection and it is probably the most comprehensively studied defense molecule. Together with other hemolymph factors such as antibacterial peptides, lysozyme is a key part of the insect immune mechanism [2]. In insects, the tobacco hornworm *Manduca sexta* is very well studied as a model for invertebrate immunity, and lysozyme has been described as a defense protein [3]. *M. sexta* lysozyme (MS-lys), and all known insect lysozymes are similar to hen egg white lysozyme (HEWL), therefore belong to the C-type family [4].

Lysozyme is a model system, being the first known three-dimensional structure of an enzyme, and thoroughly studied in protein-folding mechanistic studies [5,6]. Insect, mammalian and human lysozymes C-type have approximately 40 to 60 % identity and similar properties such as basic isoelectric point, small

molecular weight of about 15 kDa, and thermal stability [7]. Although hundreds of lysozyme crystal structures are known, they are highly biased toward studies of the HEWL. To date there are two insect lysozyme crystal structures from *Atheraea mylitta* [8] and *Bombyx mori* [9] available at the Protein Data Base.

Several biophysical techniques have been very useful to understand folding, structure and to predict protein crystallizability. Circular dichroism (CD) is a spectroscopic technique used to calculate the secondary structure content of proteins in solution [10]. Static and dynamic light scattering (SLS and DLS) have become widely used methods to understand the physico-chemical properties of aggregation states during early nucleation stages that lead to crystal growth [11]. DLS allows determination of the sample polydispersity, while SLS permits to determine molecular weight, size distribution and shape of the aggregates in solution [12,13]. In this work, we present the determination of the recombinant MS-lys secondary structure content and protein aggregation state.

## MATERIALS AND METHODS

### Recombinant Expression and Refolding of MS-lys

MS-lys was overexpressed in *E. coli* using the pET11a vector (Novagen). The lysozyme coding region of the mature polypeptide was amplified from the cDNA clone [14] (kind gift from Dr. Michael Kanost) using a high-fidelity DNA polymerase (Invitrogen) and primers MSLYZ-F<sup>1</sup> and MSLYZ-R<sup>2</sup> containing restriction sites *NdeI* and *BamHI*, respectively. The recombinant clone was sequenced on both strands and transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent bacteria (Novagen). The protein was expressed in inclusion bodies, and refolding conditions were screened from a set of buffers [15].

Briefly, bacteria were grown in Luria-Bertani broth until optical density of 0.6 at 600 nm, and induced with IPTG to a final concentration of 0.4 mM. The culture was grown overnight; the bacterial pellet was harvested and washed in 0.9% NaCl (w/v). The bacterial cells were sonicated with four pulses of 10 s at 0°C, and the lysate was centrifuged at 10,000 × g for 1 h. The bacterial pellet was washed twice with 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM EDTA, 2 M urea, 5 mM dithiothreitol (DTT), and 2% Triton X-100, using 4 ml of solution per g of pellet and centrifuged at 22,000 × g for 30 min, discarding the supernatant. The precipitate was washed in the same solution as before, but without Triton X-100. Supernatant was discarded to obtain the inclusion bodies, and were dissolved in an extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 5 mM EDTA, 8 M Guanidinium-HCl (Gnd-HCl), 5 mM DTT), using 4 ml per g of pellet.

Denatured inclusion bodies were incubated at 4°C overnight, and diluted to a final concentration of 4M Gnd-HCl with extraction buffer without Gnd-HCl. The solution was spun at 10,000 × g for 10 min and the precipitate was discarded. The inclusion bodies were refolded by a 20-fold dilution with refolding buffer (55 mM Tris-HCl pH 8.2, 1.1 mM EDTA, 1 mM oxidized glutathione, 0.1 mM reduced glutathione, 264 mM NaCl, 11 mM KCl [15]). The refolded protein was centrifuged at 10,000 × g for 1 h and the supernatant was ultrafiltered through a 30 kDa MW cut-off membrane (Millipore). Filtrated proteins were concentrated through a 10 kDa MW membrane. The retained solution was extensively dialyzed against

<sup>1</sup> 5'-GGGAATTCATATGAAACACTTCAAGCAGGTGTGAG-3'  
<sup>2</sup> 5'-CCCGGATCCTTAACAGGAGCTGAGTCAGG-3'

distilled water, obtaining pure MS-lys as determined by SDS-PAGE electrophoresis. Protein concentration was estimated by UV spectroscopy using an extinction coefficient of  $\epsilon_{\lambda 290} = 29\,160 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  calculated from the amino acid sequence [16]. Lysozyme activity was determined by the turbidimetric assay of Shugar [17] at 450 nm using a *Micrococcus luteus* suspension with an initial optical density of 0.7, in 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 at 25°C.

### Secondary Structure Analysis of MS-lys

CD spectra were acquired in a Jasco J-810 CD spectropolarimeter using a 0.1 cm path-length cell in the far-UV range (190-240 nm). The CD spectra were recorded at 25°C, every 0.5 nm with a 4-s averaging time/point and a 1 nm band-pass with a scan speed of 100 nm/min. Averaged spectra ( $n=3$ ) were corrected for the blank (distilled water) and smoothed. Secondary structure content was determined by analysis of the delta epsilon units ( $\Delta\epsilon$ ) with the SELCON algorithm [18,19] available via Internet on the DICROWEB server (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/edweb/html/>) at Birkbeck College, UK [20,21].

### Light Scattering Studies of MS-lys

The static (SLS) and dynamic (DSL) light scattering measurements were performed on an ALV-5000 digital correlator (ALV, GmbH, Langen, Germany) with temperature controller to maintain the cell at  $25 \pm 0.1$  °C. The scattered light was vertically polarized with a  $\lambda_a = 632$  nm. The intensity of the argon laser (30 mW) was measured at different angles in the range of 40° to 150°. The reduced elastic scattering  $I(q) KC$ , with  $K = 4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 (I^{90}/R^{90}) / \lambda_a^4 N_A$  was measured in steps of 10° in the scattering angle, where  $n_0$  is the refractive index of the standard (toluene);  $I^{90}$  and  $R^{90}$  are the intensity and the Rayleigh ratio of the standard at  $\theta = 90^\circ$ , respectively; the increment of the refractive index was assumed as 0.16 for proteins. Protein sample was filtered through a 0.2  $\mu$  PVDF membrane and used at 1.90, 0.95 and 0.48 mg/ml. For this calculation the protein concentration ( $C$ ) was expressed in g/cm<sup>3</sup>,  $I(q)$  is the intensity scattered by the sample and  $N_A$  is the Avogadro number. The scattering vector  $q$  is given by  $q = (4\pi/\lambda_a)\sin(\theta/2)$  and  $n$  is the refractive index of the medium ( $n = 1.33$ ). The data were analyzed using the Zimm equation [22]. The hydrodynamic radius  $R_H$  was calculated for the three protein concentrations through the Stokes-Einstein relation

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}, \quad (1)$$

where  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the absolute temperature and  $\eta$  the viscosity of the solvent.

## RESULTS AND DISCUSSION

MS-lys was produced in recombinant form as the mature polypeptide plus a methionine as the initial residue. We were able to purify the enzyme by removal of interfering proteins using ultrafiltration membranes. MS-lys was pure as shown by silver-stained reducing and non-reducing SDS-PAGE (Figure 1), and therefore we proceeded to the biophysical characterization. MS-lys was active against *Micrococcus luteus* in the turbidimetric assay, although it presented an specific activity of 4,850 units mg<sup>-1</sup>, which is twelve-times less than HBWL.

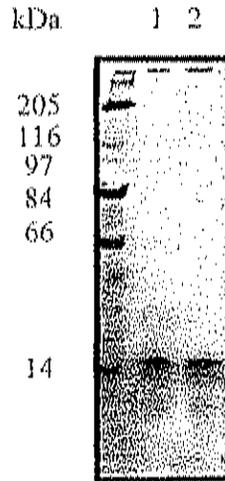


Figure 1. Electrophoretic analysis of MS-lys. Lane 1 SDS-PAGE with reducing agent ( $\beta$ ME). Lane 2 SDS-PAGE without reducing agent.

### Secondary Structure of MS-lys

MS-lys is about 40% identical to HEWL and ~ 80% to silkworm and Tassar worm lysozyme. To compare MS-lys to these proteins where the three-dimensional structure is known, we made a sequence alignment with secondary structure assignment (Figure 2). Also, the far-UV CD spectra of the MS-lys in distilled water was determined (Figure 3). Analysis of the MS-lys mean residue ellipticities led to a calculated secondary structure comprised of 57%  $\alpha$ -helix, 2.5% of  $\beta$ -sheets, 20 % of loops and turns and 20.5% of unordered structure. This experimental result is consistent with the secondary structure assignment from the sequence alignment shown.

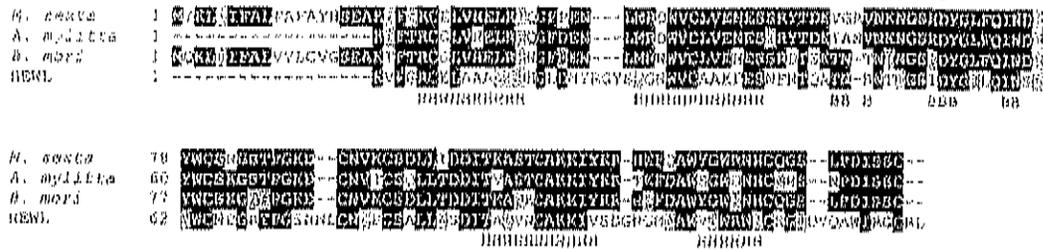


Figure 2. Sequence alignment and secondary structure assignment of insect and hen egg white lysozyme. Labels (H) are for  $\alpha$  helix and (B) for  $\beta$ -sheet (B) based on HEWL (PDB 2CDS). The catalytic residues E35 and D52 are labeled with an asterisk. *Manduca sexta* (accession number 7327646), *Antheraea mylitta* (accession number 17943393), *Bombix mori* (accession number 567099), HEWL (hen egg white lysozyme, accession number 31616035).

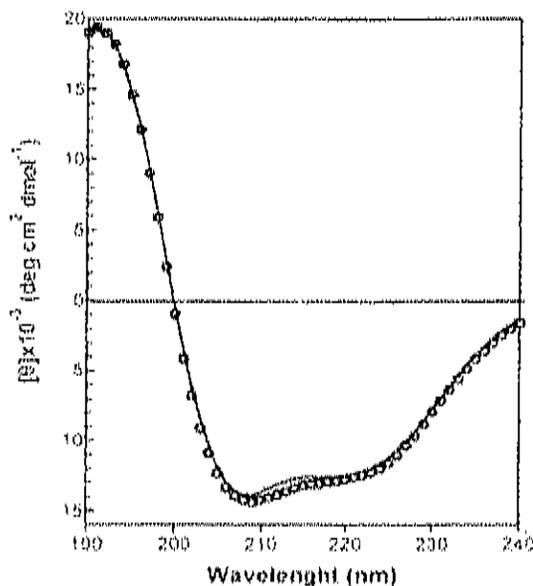


Figure 3. CD spectra of MS-lys. Experimental mean residue ellipticities are represented by open circles (o) and reconstructed spectra in continuous line (—). RMSD of fitting was 0.23.

Lysozymes from other organisms are also mainly  $\alpha$ -helical, although MS-lys appears to have the highest content of all. The silkworm *Bombix mori* has  $\alpha$ =32.7% and  $\beta$ =3.1% [9], and Tassar silkworm *Antheraea mylitta* has  $\alpha$ =34.2 and  $\beta$ =6.7% [8]. Although these numbers are based in their crystal structures, they should not differ significantly from their values in solution. It has been recently indicated that secondary structure content similarity does not preclude the same folding [23], although sequence similarity between insect lysozymes [24] and biochemical activity ensure that MS-lys has a *bona-fide* hydrolase(*o*-glycosyl) fold [25].

#### Aggregation State of MS-lys

DLS of MS-lys was done obtaining the electric autocorrelation function  $g^E(t)$  for protein concentrations of 1.9, 0.95 and 0.48 mg/ml. Estimation of aggregates size distribution was done by modeling  $g^E(t)$  with the equation:

$$g^E(t) = A_{fast}(q)e^{-t/\tau_{fast}} + A_{slow}(q)e^{-t/\tau_{slow}}, \quad (2)$$

where  $\tau_{fast}$  and  $\tau_{slow}$  are respectively the fast and the slow relaxation times characteristic of smaller and larger protein aggregates [26].  $A_{fast}(q)$  and  $A_{slow}(q)$  are the corresponding amplitudes and  $q$  is the scattering angle given above. The scattering data obtained at 0.48 mg/ml protein concentration was used to fit the autocorrelation function to eq. (2).

In order to determine the dependence of  $\tau_{fast}$  and  $\tau_{slow}$  with  $q^2$ , the product  $1/\tau q^2$  against  $q^2$  was plotted for the two modes. There was no apparent dependence of  $q^2$  to correlation times for both slow and

fast modes, indicating a diffusive regime for both sizes of aggregates. Adopting the classical cumulant analysis [27], and assuming the extrapolation of  $1/\tau q^2$  to  $q=0$ , the mutual diffusion coefficient  $D$  was obtained, which is related to the hydrodynamic radius  $R_H$  from (1).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \left[ \frac{1}{\tau q^2} \right]_{q \rightarrow 0} \quad (3)$$

It was observed that the mutual diffusion constant for the slow mode ( $D_{slow}$ ) decreased with the protein concentration in as previously report for the monomeric HEWL solutions [28]. However, calculation of the MS-lys  $D_{slow} = 2.78 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  from eq. (2), resulted in a smaller value compared to HEWL, ( $D_{slow} = 10 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) and did not showed a clear  $q^2$  dependence. The diffusion constant for the fast mode was  $D_{fast} = 1.7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Hydrodynamic radii were calculated according to eq. (3) and using the ALV software but we used the values from the latter method, since it leads to a better data fitting.  $R_H$  for the slow mode indicated the presence of very large protein aggregates.

Large aggregates had an average hydrodynamic radius of  $R_H = 64 \text{ nm}$  and a peak weight of 94 %, while smaller aggregates only contributed to a 5% and had an average radius of 4 nm (Fig. 3). MS-lys in distilled water has a monodispersed solution composed of very large aggregates. Although the protein was purified by ultrafiltration through a 30 kDa membrane just after refolding, storage at 4°C during 1-14 hr before measurement was sufficient to produce protein aggregation. Time-dependent aggregation of HEWL in the range of minutes has been recently reported, where hydrodynamic radius in the order of hundreds of nm are clearly observed [29].

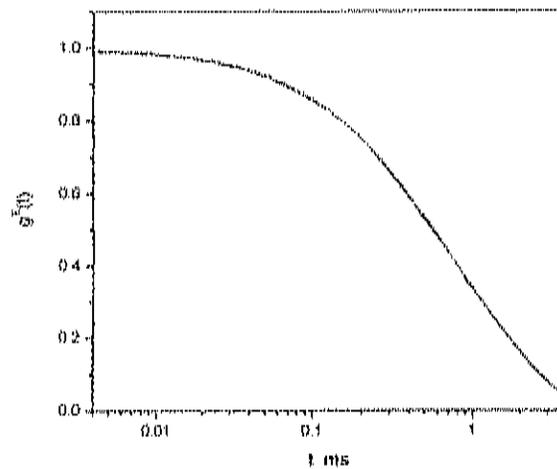


Figure 4. Fitting to the correlation function  $g^2(t)$ . Fitting of eq (2) gave values of  $A_{fast}(q) = 0.84821 \pm 0.00991$ ,  $A_{slow}(q) = 0.152 \pm 0.00976$ ,  $\tau_{fast} = 1.04592 \pm 0.01669$  and  $\tau_{slow} = 0.16559 \pm 0.0096$ .

To model the shape of the aggregates, SLS was performed using the Zimm plot method [30] for several concentrations of MS-lys. The results showed a radius of gyration ( $R_g = 90.5 \text{ nm}$ ) and a molecular

weight of  $10.3 \times 10^6$  Da. Therefore, the large aggregates are composed of ~715 MS-lys molecules. On the other hand, the quotient  $R_g / R_H = 1.41$  indicates a non-spherical molecular structure. Fitting of the form factor  $P(q)$  against the scattering vectors used show that the aggregates take an elongated shape that can be considered as thin rods of 313 nm long.

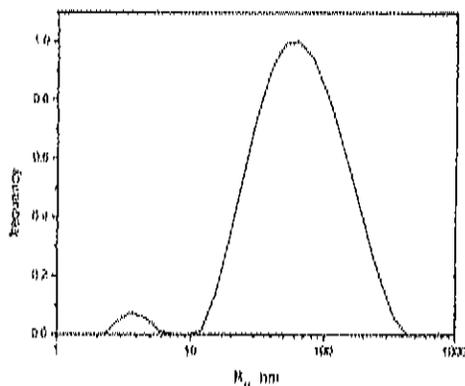


Figure 5. Size distribution of MS-lys aggregates. Hydrodynamic radius for the slow mode is  $R_{h,slow} = 64$  nm and  $R_{h,fast} = 4$  nm.

Lysozymes have been thoroughly studied as folding and structural models and biologically because its antibacterial activity. Invertebrate lysozymes have been less studied and have singular structural features as revealed from the crystal structure of an insect cold-adapted lysozyme. Tobacco hornworm lysozyme MS-lys was produced by bacterial overexpression and refolding of inclusion bodies. The protein yield was ~1.5 mg of MS-lys per l of bacterial culture; although this protocol did not required chromatography purification steps by using sequential ultrafiltration.

Circular dichroism showed that MS-lys was folded and active as determined in assays against *Az. luteus*. MS-lys in aqueous solution was monodisperse and aggregates had a thin rod shape composed of ~715 monomers. It has been shown that HEWL nucleates in rod-like particles previous to crystallization [11], therefore MS-lys is a good candidate for X-ray crystal 3D-structure determination.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

R.R. Sotelo-Mundo acknowledges support from grant 36928-B and M. A. Valdez from grant ER074 (Materiales Biomoleculares), both awarded by CONACyT (México) and grant A/3230-I from International Foundation for Science. E.F. Velazquez acknowledges grant P/FOMES-2000-26-01 from SESICA. A. López-Zavala, E. de-la-Re-Vega and S.A. Calderón-Arredondo received scholarships from CONACyT. E.R.V. acknowledges supplementary support from CIAD-Coordinación de Docencia. M.A. Islas-Osuna thanks support from CONACyT (Programa de Consolidación Institucional: Jóvenes Investigadores). Thanks are given to Gloria Yepiz-Plascencia for critical reading of the manuscript and to José Alberto López-Díaz for help on CD analysis.

## REFERENCES

- [1] Jolles, P. and Jolles, J. (1984) *Mol. Cell. Biochem.*, *63*, 165-189.
- [2] Yu, K.H., Kim, K.N., Lee, J.H., Lee, H.S., Kim, S.H., Cho, K.Y., Nam, M.H. and Lee, I.H. (2002) *Dev. Comp. Immunol.*, *26*, 707-713.
- [3] Spies, A.G., Kallinsey, J.E. and Spence, K.D. (1986) *Comp. Biochem Physiol. B: Comp Biochem.*, *83*, 125-133.
- [4] Hultmark, D. (1996) *Exp.*, *75*, 87-102.
- [5] Fernandez-Souza, J.M., Gavilanes, J.G., Municlo, A.M. and Rodriguez, R. (1979) *Comp. Biochem. Physiol. B: Comp Biochem.*, *62*, 389-392.
- [6] Hooke, S.D., Radford, S.E. and Dobson, C.M. (1994) *Biochemistry*, *33*, 5867-5876.
- [7] Ito, Y., Yoshikawa, A., Hotani, T., Fukuda, S., Sugimura, K. and Imoto, T. (1999) *Eur. J. Biochem.*, *259*, 456-461.
- [8] Jain, D., Nair, D.T., Swaminathan, G.J., Abraham, E.G., Nagaraju, J. and Salunke, D.M. (2001) *J. Biol. Chem.*, *276*, 41377-41382.
- [9] Matsuura, A., Yao, M., Aizawa, T., Koganesawa, N., Masaki, K., Miyazawa, M., Demata, M., Tanaka, I., Kawano, K. and Nitta, K. (2002) *Biochemistry*, *41*, 12086-12092.
- [10] Kelly, S.M. and Price, N.C. (1997) *Biochim. Biophys. Acta.*, *1338*, 161-185.
- [11] Drenth, J., Dijkstra, K., Haas, C., Leppert, J. and Ohlenschläger, O. (2003) *J. Phys. Chem.*, *107*, 4203-4207.
- [12] Skouri, M., Delsanti, M., Munch, J.P., Lorber, B. and Giege, R. (1991) *FEBS Lett.*, *293*, 84-88.
- [13] Wilson, W.W. (2003) *J. Struct. Biol.*, *142*, 56-65.
- [14] Mulnix, A.B. and Dunn, P.E. (1994) *Insect Biochem.*, *24*, 271-281.
- [15] Armstrong, N., de Lencastre, A. and Gouaux, E. (1999) *Protein Sci.*, *8*, 1475-1483.
- [16] Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989) *Anal. Biochem.*, *182*, 319-326.
- [17] Shugar, D. (1952) *Biochim. Biophys. Acta.*, *5*, 302-309.
- [18] Hennessey, J.P., Jr. and Johnson, W.C., Jr. (1981) *Biochemistry*, *20*, 1085-1094.
- [19] Sreerama, N. and Woody, R.W. (1993) *Anal. Biochem.*, *209*, 32-44.
- [20] Lobley, A. and Wallace, B.A. (2001) *Biophys. J.*, *80*, 373a.
- [21] Lobley, A., Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2002) *Bioinformatics*, *18*, 211-212.
- [22] Zimm, B.H. (1948) *J. Chem. Phys.*, *16*, 1093-1099.
- [23] Oberg, K.A., Ruyschaert, J.M. and Goormaghtigh, E. (2003). *Protein Sci.*, *12*, 2015-2031.
- [24] Lesk, A. and Chothia, C. (1980) *J. Mol. Biol.*, *15*, 225-270.
- [25] Orongo, C.A., Michie, A.D., Jones, S., Jones, D.T., Swindells, M.B. and Thornton, J.M. (1997) *Structure*, *5*, 1093-1108.
- [26] Esquenet, C. and Buhler, E. (2001) *Macromolecules*, *34*, 5287-5294.
- [27] Koppel, D.E. (1972) *J. Chem. Phys.*, *57*, 4818.
- [28] Grisby, J.J., Blanch, H.W. and Prausnitz, J.M. (2000) *J. Phys. Chem. B.*, *104*, 3645-3650.
- [29] Poznanski, J., Georgalis, Y., Wehr, L., Saenger, W. and Zielenkiewicz, P. (2003) *Biophys. Chem.*, *104*, 605-616.
- [30] Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Clide, B., Moreno, R.F. and *et al.* (1991) *Science*, *252*, 1651-1656.

**Recombinant bacterial expression, refolding and affinity purification of the C-lysozyme from the tobacco-hornworm *Manduca sexta***

**Karina D. García-Orozco<sup>1</sup>, Alonso A. López-Zavala<sup>1</sup>, Daniel Puentes-Camacho<sup>1</sup>, Ana María Calderón-de-la-Barca<sup>2</sup> and Rogerio R. Sotelo-Mundo<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Aquatic Molecular Biology Laboratory and <sup>2</sup>Nutrition Department,  
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Hermosillo Sonora 83000 México

\*Corresponding author: Rogerio R. Sotelo-Mundo, Ph.D.  
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.  
Km 0.6 Ejido a La Victoria  
P.O. Box 1735.  
Tel. +52 (662)289-24-00  
Fax. +52 (662) 280-04-21  
E-mail: rrs@cascabel.ciad.mx

**KEYWORDS**

Lysozyme, affinity chromatography, *Manduca sexta*, bacterial overexpression, refolding

## **Abstract**

Bacterial overexpression of heterologous genes is widely used for the production of high quantities of proteins for biochemical, structural or pharmaceutical applications. However, high level expression of recombinant proteins containing disulfide bonds, often results in aggregation and accumulation in inclusion bodies, which itself may be advantageous if proper folding conditions are found. A lysozyme from the insect *Manduca sexta* (Ms-lyz) was expressed using the T7 polymerase system and accumulated as inclusion bodies. The protein was refolded and was purified by affinity and ion-exchange chromatography, and was active against *Micrococcus luteus*. Recombinant Ms-lyz will allow addressing the role of glycosylation in future works.

## **Introduction**

Expression of heterologous genes in bacteria is widely used in industry and in research laboratories, for the production of proteins for pharmaceutical, structural and biochemical applications. The abundance of protein expression systems renders the efficient bacterial production of most possible proteins. However, high level bacterial recombinant expression of disulfide-bonded or secreted proteins, ends up in inclusion bodies (De Bernandez 1998; Fischer *et al.* 1993).

Even endogenous proteins, if overexpressed, may accumulate in inclusion bodies, suggesting that in the majority of the cases aggregation is a consequence of high expression rates, regardless of the system used. There is no direct correlation between the propensity of inclusion body formation of a certain protein and intrinsic properties, such as molecular weight, hydrophobicity or other characteristics (Lilie *et al.* 1998). Only in the case of disulfide bonded proteins can inclusion body

formation be anticipated if the protein is produced in the bacterial cytosol. This is due to the fact that formation of the disulfide bonds is not possible under the reducing conditions of the cytosol.

The choice of host for the production depends mainly on the properties and the final use of the expressed protein. If the protein requires substantial post-translational modifications, the preferred host is a higher eukaryotic organism such as yeast, *Pichia pastoris*, baculovirus or mammalian cell lines. *Escherichia coli* (*E. coli*) has been successfully used for production of relatively complex proteins, and progress over recent years has widened the use of this organism even further by use of *in vitro* refolding (Baneyx 1999).

The general strategy used to recover active protein from inclusion bodies involves three steps: inclusion body isolation and washing, solubilization of the aggregated protein in a chaotrope (urea or guanidinium-HCl) and refolding of the solubilized protein by removal of the denaturing agent, by dilution or dialysis. Although the efficiency of the first two steps can be relatively high, renaturation yields may be limited by the accumulation of inactive misfolded species as well as aggregates. Disulfide-bond formation is one of the most difficult processes to occur during refolding (De Bernandez 2001; Fischer *et al.* 1993).

One of the most studied enzymes is lysozyme (EC 3.2.1.17), used as a model for folding, catalysis and structure. Lysozyme is one of the best-characterized hydrolases, which cleaves the  $\beta$ -1, 4 glycosidic bond between N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid in the Gram-positive bacteria peptidoglycan (Jolles and Jolles 1984). Based on their amino acid sequence, lysozymes are classified into chicken type (C-type), goose type (G-type), and phage type (T4-type). These three different classes of lysozyme have overall similarities in tertiary structure, although their amino acid sequence are almost entirely different. The amino acid sequence of lysozyme has been

reported for many birds, mammals, fishes and insects. Insects appear to have the C-type lysozymes and Ms-lyz appears to be an important model to understand structure and function due to its digestive role (Regel *et al.* 1998) and its adaptation to cold temperatures (Matsuura *et al.* 2002). This itself deserves further consideration for its biotechnological application as an antibacterial under low temperatures.

Refolding of artificially disulfide-reduced and denatured hen egg white lysozyme has been extensively studied and modeled (Dong *et al.* 2004). However, refolding of lysozyme inclusion bodies implies lack of glycosylation, which may be a critical factor in obtaining back native structure. Early work in bacterial protein overexpression was done using hen egg lysozyme (Miki *et al.* 1987), and folded recombinant lysozyme was obtained by directing its localization to periplasm by fusion with the OmpA signal sequence (Fischer *et al.* 1993). However, to our best knowledge no lysozyme from other species has been overexpressed in bacteria.

In this study, we overexpressed in *E. coli* the lysozyme from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* as inclusion bodies, and enzyme was refolded and purified by affinity and ion exchange chromatography.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Recombinant Expression and Refolding of Ms-lyz*

Ms-lyz was overexpressed in *E. coli* using the pET11a vector (Novagen). The lysozyme coding region of the mature polypeptide was amplified from the cDNA clone (kind gift from Dr. Michael Kanost) using a high-fidelity DNA polymerase (Invitrogen) and primers MSLYZ-F (5'-GGGAATTCCATATGAAACACTTCAGCAGGTGTGAG-3') and MSLYZ-R (5'-

CGCGGATCCTTAACAGGAGCTGAGTCAGG-3') containing restriction sites *NdeI* and *BamHI*, respectively. The recombinant clone was sequenced on both strands and transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent bacteria (Novagen). The protein was expressed in inclusion bodies, and refolding conditions were screened from a set of buffers (Armstrong *et al.* 1999).

A preparation of 1 l of bacterial culture was made. Fermentation was done in Fernbach flasks with an inoculum of 25 ml of an overnight culture. Briefly, bacteria were grown in Luria-Bertani broth with antibiotic until an optical density of 0.6 at 620 nm was reached, and induced with isopropylthiogalactoside (IPTG) to a final concentration of 0.4 mM. The culture was grown overnight and the bacterial pellet was harvested and washed in 0.9% NaCl (w/v). The bacterial pellet was sonicated (four pulses of 10 s at 0 °C) in lysis buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM benzamidine, 5 mM dithiotriethol (DTT) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and the lysate was centrifuged at 10,000 g for 1 h at 4 °C. The protein was expressed in inclusion bodies, as determined by SDS-PAGE from soluble and insoluble fractions of the bacterial lysate. The pellet with inclusion bodies was washed twice using 4 ml of 0.05 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, 5 mM EDTA, 2 M Urea, 5 mM DTT, and 2% Triton X-100, per g of pellet, the solution was sonicated and centrifuged at 22,000 g for 30 min, discarding the supernatant. Then, the pellet was washed twice in the same buffer, but without detergent. The inclusion bodies obtained, were dissolved in extraction buffer (0.05 M Tris-HCl pH 7.0, 5 mM EDTA, 8 M guanidine-HCl (Gnd-HCl), 5 mM DTT, at a ratio of 4 ml g<sup>-1</sup>). Denatured protein was diluted at a final concentration of 4 M Gnd-HCl with extraction buffer without chaotropic agent. The solution was centrifuged at 10,000 g for 10 min and the precipitate was discarded.

The Ms-lyz refolding was obtained by exhaustive dialysis of denatured inclusion bodies (4 M Gnd-HCl) against buffer containing 0.055 M Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.1 mM oxidized glutathione, 1 mM reduced glutathione, 264 mM NaCl, 11 mM KCl and 550 mM Gnd-HCl (Armstrong *et al.* 1999) with three changes of buffer. The refolded protein was centrifuged at 10,000 g for 1 h. Then, the solution was dialyzed exhaustively against phosphate buffer 0.05 M, pH 6.0. All steps were monitored by protein concentration using the Bradford method (Bradford 1976), SDS-PAGE electrophoresis and lysozyme activity by means of the turbidimetric lysozyme assay (Shugar and Fox 1952).

#### *Preparation of Micrococcus luteus affinity matrix*

The affinity column was prepared by crosslinking Mini-Leak™ divinyl-sulphone agarose (Kem-Em-Tec, Copenhagen Denmark) to *M. luteus* (Calderon de la Barca *et al.* 1991). Briefly, the Mini-Leak\_High™ was washed twice with 3-4 volumes of distilled water on a suction filter and drained until the matrix was dried. As the affinity ligand, *M. luteus* was suspended in 1 M sodium carbonate, pH 11 (0.16 g ml<sup>-1</sup>) and mixed with the activated matrix to a relation of 0.05-0.2 g of ligand per g of matrix. The complex was mixed overnight at 25 °C in an oscillating plate shaker at very low speed. Excess active groups were blocked by reaction with 0.1 M ethanolamine/HCl pH 11.0, the matrix was mixed for 2 h at 25 °C. To eliminate the excess of *M. luteus*, the conjugated matrix was exhaustively washed with distilled water, and packed into a column at low pressure using a GradiFrac liquid chromatography system (Pharmacia).

#### *Ms-lyz chromatographic purification*

The dialyzed refolded Ms-lyz was purified by affinity chromatography on the *M. luteus*-MiniLeak column (10 ml) described above. The column was equilibrated with phosphate buffer 0.05 M, pH

6.0 (buffer A) and the protein sample was loaded at 18 ml h<sup>-1</sup>. The elution was performed with a gradient of 0 to 1 M NaCl in buffer A, at a flow rate of 30 ml h<sup>-1</sup>. Fractions of 1 ml were collected, absorbance at 280 nm was monitored during the elution, and representative samples of elution peaks were assayed for lysozyme activity (see below) and pooled.

As an additional purification step, ion-exchange chromatography was used. Pooled fractions containing lysozyme activity were dialyzed against buffer A. This sample was loaded into a 6.0 ml SP-Sepharose Fast Flow column (Pharmacia), previously equilibrated with buffer A. Bound proteins were eluted using a salt gradient from 0 to 1 M NaCl in buffer A, at a flow rate of 36 ml h<sup>-1</sup>. Fractions of 1 ml were collected and the absorbance at 280 nm was monitored. Protein concentration was determined using the Bradford method (Bradford 1976).

#### *Electrophoresis*

Purity and homogeneity of protein samples were determined by SDS-PAGE (Laemmli 1970). Gels were run at a Mini-Protean 3 electrophoresis system (Bio-Rad), and stained with 1% Coomassie Brilliant Blue R250 or by silver stain (De Silva *et al.*, 1995).

#### *Lysozyme Activity*

The activity of the refolded protein was determined by the turbidimetric lysozyme assay (Shugar and Fox 1952). A suspension of *M. luteus* was prepared in 0.05 M phosphate pH 6.0 with an optical density of ~ 0.7 at 450 nm. The change in 0.001 units of absorbance by minute was defined as one unit of lysozyme activity.

#### *N-terminal amino acid sequence*

To verify the identity of the recombinant purified Ms-lyz recombinant pure protein was separated by SDS-PAGE and electro-transferred to PVDF membranes. Membrane was stained with

Coomassie Blue R250 and extensively rinsed in distilled water. The 14 kDa band was cut out and subjected to N-terminal sequencing by Edman degradation in a protein/peptide sequencer (ABI model 477A Protein Sequencer, Perkin Elmer) with an on-line ABI model 120A HPLC in the Molecular Structure Facility at the University of California, Davis.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Production of lysozyme and its refolding from inclusion bodies*

Ms-lyz was successfully overexpressed in *E. coli*, refolded and purified to homogeneity. While hen egg white lysozyme has been expressed in eukaryotic systems such as *Aspergillus* (Archer *et al.* 1990), yeast (Nakamura *et al.* 1993), and the insect lysozyme from *Bombyx mori* in *Plecha pastoris* (Matsuura *et al.* 2002), bacterial expression of lysozymes is not trivial due to the protein refolding conundrum.

Recombinant expression of Ms-lyz was evident after induction with IPTG in a total bacterial lysate, as a band of 14.9 kDa on an SDS-PAGE (Figure 1, lanes 1 and 2). Ms-lyz was in the inclusion bodies, as observed by SDS-PAGE of the insoluble fraction washed with detergents and solubilized with 8 M Gnd-HCl (Figure 1, lane 3). Refolded Ms-lyz was obtained after screening the conditions indicated in the literature (Armstrong *et al.* 1999) (Figure 1, lane 4), using the lysozyme assay to test activity (Figure 2).

However, the refolded Ms-lyz was contaminated with several proteins in the range of 20-95 kDa, and therefore further purification was required. Affinity chromatography was thought to be the most suitable method to select for recombinant molecules properly folded, since the interaction

with the substrate should occur only when the correct disulfide bonds were formed. Also, this purification method should exclude conformers with scrambled structure.

For this purpose, *M. luteus* was covalently conjugated to an activated Sepharose matrix (Mini-Leak<sup>TM</sup>) as described above. Ms-lyz was purified by *M. luteus* affinity chromatography by elution with a salt gradient. Non-bound proteins were eluted by washing (Figure 3, panel A, peak I), and SDS-PAGE revealed that it contained many contaminating proteins. Ms-lyz eluted at 1 M NaCl and was shown to still have contaminant proteins by SDS-PAGE, and in particular a smaller size band of ~ 10 kDa (Figure 1, panel B, lane 2). Fractions from peak II with lysozyme activity were pooled, dialyzed against phosphate buffer (50 mM, pH 6.0) and polished using ion exchange chromatography on SP-Sepharose (Figure 3, panel B). Ms-lyz was eluted at 1 M NaCl (peak II), obtaining a single band on SDS-PAGE with an apparent MW of 14.9 kDa (Figure 1, panel B, lane 3). The identity of the recombinant protein was confirmed by amino-terminal sequencing of the pure protein by Edman degradation, and it was identical to the deduced cDNA sequence (Muhlix and Dunn 1994) plus an initial methionine residue required for bacterial expression.

The purification data for Ms-lyz is summarized in Table 1. Two steps were required to obtain a pure Ms-lyz, and the purification was started with 20 ml of soluble inclusion bodies in 4 M Gnd-HCl. Since one liter of cultured bacteria yields ~ 50 ml of soluble inclusion bodies, the total yield would be 175  $\mu\text{g}$  of Ms-lyz  $\text{l}^{-1}$  of media. This yield may appear to be extremely low, but scale-up on a bioreactor and optimization of growth conditions may increase the yield of biomass and therefore inclusion bodies as well. Another critical factor is the loss of protein as aggregates during refolding and this may be suitable for further optimization using additives (Vallejo 2004).

Inclusion body formation is considered a fastidious and disadvantageous feature of bacterial protein expression systems. However, it protects the expressed polypeptide from proteolytic degradation but relies on obtaining adequate renaturation conditions that recreate the native structure (Carrio and Villaverde 2002). For secreted proteins this also implies the formation of the cognate disulfide bonds in the absence of leading peptide, since scrambled proteins are seldom active. *Manduca sexta* lysozyme is an enzyme with features that deserve further biochemical and biophysical characterization. Some insect lysozymes are reported to have enzymatic and antibacterial activity at low temperatures (Matsuura *et al.* 2002). Since bacterially-expressed Ms-lyz is not glycosylated, this will allow testing the role of this post-translational modification on the function, since the enzyme can be purified from the insect hemolymph. Ms-lyz may also be useful as a parallel system to study protein refolding besides the widely used hen egg lysozyme.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by grants 36928-B and 41184-Z from CONACyT (National Research Council of Science and Technology of México) and by grant A/3230-1 from International Foundation for Science (Sweden). A. López-Zavala and D. Puentes-Camacho received scholarships from CONACyT. We thank Dr. Maria A. Islas-Osuna for critical reading and editorial suggestions during the preparation of this manuscript.

## REFERENCES

- Archer DB, Jeenes DJ, MacKenzie DA, Brightwell G, Lambert N, Lowe G, Radford SE and Dobson CM (1990) Hen egg white lysozyme expressed in, and secreted from, *Aspergillus niger* is correctly processed and folded. *Biotechnology (NY)* **8**: 741-5.

- Armstrong N, De Lencastre A and Gouaux E (1999) A new protein folding screen. Application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Sci.* **8**: 1475-1483.
- Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* **10**: 411-421.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.
- Calderon de la Barca AM, Vazquez-Moreno L and Robles-Burgueño MR (1991) Active soybean lectin in foods - isolation and quantitation. *Food Chem.* **39**: 321-327.
- Carrio MM and Villaverde A (2002) Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* **96**: 3-12.
- De Bernandez CE (1998) Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotech.* **9**: 157-163.
- De Bernandez CE (2001) Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotech.* **12**: 202-207.
- Dong XY, Shi GQ, Li W and Sun Y (2004) Modeling and simulation of fed-batch protein refolding process. *Biotechnol. Prog.* **20**: 1213-9.
- Fischer B, Perry B, Phillips G, Sumner I and Goodenough P (1993) Physiological consequence of expression of soluble and active hen egg white lysozyme in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 537-40.
- Fischer B, Sumner I and Goodenough P (1993) Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion-bodies. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 3-13.
- Jolles P and Jolles J (1984) What's new in lysozyme research?. Always a model system, today as a yesterday. *Mol. Cell. Biochem.* **63**: 165-189.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lilie H, Schwarz E and Rudolph R (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotech.* **9**: 497-501.
- Matsuura A, Yao M, Aizawa T, Koganesawa N, Masaki K, Miyazawa M, Demura M, Tanaka I, Kawano K and Nitta K (2002) Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures. *Biochemistry* **41**: 12086-92.
- Miki T, Yasukochi T, Nagatani H, Furuno M, Orita T, Yamada H, Imoto T and Horiuchi T (1987) Construction of a plasmid vector for the regulatable high level expression of eukaryotic genes in *Escherichia coli*: an application to overproduction of chicken lysozyme. *Protein. Eng.* **1**: 327-32.
- Mulnix AB and Dunn PE (1994) Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**: 271-81.
- Nakamura S, Takasaki H, Kobayashi K and Kato A (1993) Hyperglycosylation of hen egg white lysozyme in yeast. *J. Biol. Chem.* **268**: 12706-12.
- Regel R, Matioli SR and Terra WR (1998) Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**: 309-319.

- Shugar D and Fox JJ (1952) Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. I. Pyrimidines. *Biochim. Biophys. Acta.* **9**: 199-218.
- Vallejo LF (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories* **3**.

## Figure and Table Legends

Figure 1. **SDS-PAGE analysis of the expression and purification of recombinant Ms-lyz.** Panel **A**, overexpression of lysozyme *Manduca sexta* recombinant from *E. coli*. MW, molecular markers Broad Range BIORAD; lane 1, bacteria without induction; lane 2, bacteria induced with IPTG; lane 3, inclusion bodies in 8 M Gdn-HCl; lane 4, refolded protein with reduced and oxidized glutathione; lane 5, dialyzed against 50 mM phosphates pH 6.0. Gel was stained with Coomassie Blue R250. Panel **B**, purification of recombinant Ms-lyz. MW, molecular markers; lane 1, protein in 50 mM phosphates pH 6.0; lane 2, peak II from affinity chromatography *Micrococcus luteus* column; lane 3, lysozyme re-purified by SP-Sepharose chromatography. Gel was stained by the silver stain method. Both gels were done on a 10-20 % acrylamide gradient.

Figure 2. **Assay activity of refolded Ms-lyz against *Micrococcus luteus*.** Decrease in optical density at 450 nm is due to lysis of *M. luteus* suspension by breakdown of bacterial peptidoglycan.

Figure 3. **Elution profile of recombinant lysozyme from *Manduca sexta*** A) Affinity Chromatography on Mini-Leak/*Micrococcus luteus* Column. Sample of folded protein 0.05 M phosphates pH 6.0 was applied to the column and eluted with the 1 M NaCl in same buffer (flow rate = 30 ml h<sup>-1</sup>). B) SP-Sepharose cation exchange column (6 ml). Ms-lyz containing fractions from affinity column were equilibrated with buffer A and applied to the column. A linear gradient of NaCl diluted in buffer A was applied (buffer B) for elution. Flow rate: 36 ml h<sup>-1</sup>. Ms-lyz was eluted at 1 M NaCl.

Table 1. **Summary of the purification of recombinant Ms-lyz from *E. coli*.** Purification was started from 20 ml of refolded Ms-lyz in 4 M Gdn-HCl

Table 1.

<b>Purification Step</b>	<b>Total Activity (U)</b>	<b>Total Protein (mg)</b>	<b>Specific activity (U mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Purification fold</b>	<b>Yield %</b>
Crude enzyme Phosphate 50 mM pH 6.0	93,793	1,832	51,256	1.0	100
Affinity chromatography <i>M. luteus</i>	15,225	0.17	90,050	1.8	9
Ion-exchange Chromatography SP-Sepharose	6,955	0.07	101,533	2.0	7

Figure 1

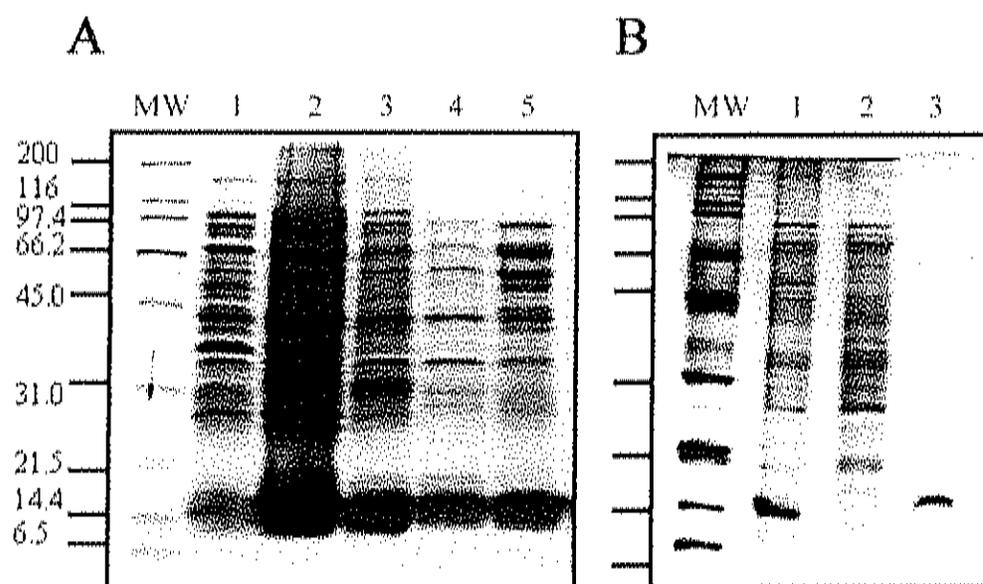


Figure 2

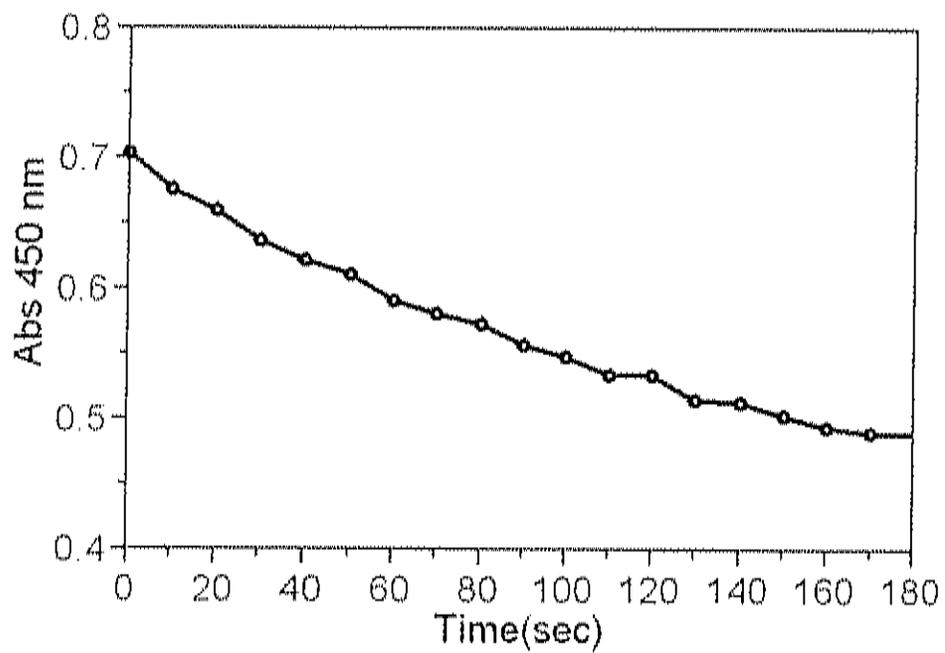


Figure 3

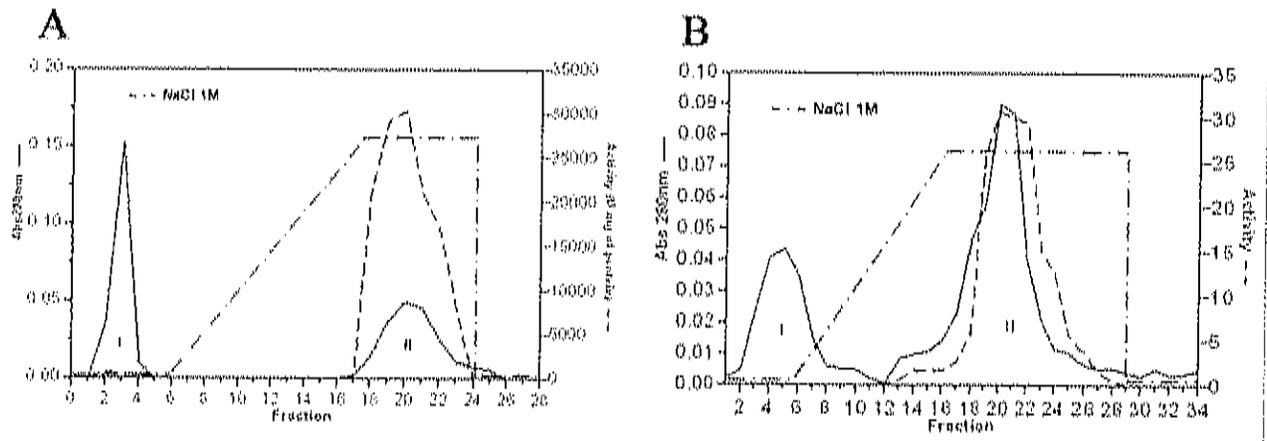


Figure 3

