CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA BETALACTAMASA DE *Pseudomonas fluorescens* PRODUCIDA DE FORMA RECOMBINANTE

TATIANA CASTRO CAMPO

LAURA MARCELA VALENCIA TORRES

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE QUÍMICA

SANTIAGO DE CALI

2016

CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA BETALACTAMASA DE *Pseudomonas Fluorescens* PRODUCIDA DE FORMA RECOMBINANTE

TATIANA CASTRO CAMPO

LAURA MARCELA VALENCIA TORRES

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN QUÍMICA

DIRECTOR DEL PROYECTO

ARAM JOEL PANAY ESCOBAR, Ph.D

SANTIADO DE CALI

2016

APROBADO POR:

_____	_____
Álvaro Barrera Ocampo, Ph.D	**Aram Joel Panay Escobar**
Evaluador.	**Tutor del proyecto.**

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestro tutor Aram Joel Panay por su dedicación y esfuerzo para la culminación de este proyecto, también a la Universidad Icesi por brindarnos el espacio y la formación académica para desarrollar este proyecto, a nuestros padres por su apoyo incondicional en nuestro proceso educativo. Por último, a nuestros compañeros de pregrado por su colaboración día a día en esta etapa que culmina.

CONTENIDO

RESUMEN DEL TRABAJO.....7
ABSTRACT.....8
1. INTRODUCCIÓN 9
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO 11
2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia: 11
2.2. Marco teórico y estado del arte.....13
2.2.1. Mecanismo de acción de los antibióticos β –lactámicos.....14
2.2.2. Mecanismo de acción de las betalactamasas 16
2.2.3. Cinética enzimática de las enzimas betalactamasas.....17
2.2.4. Otras investigaciones 18
2.3. Objetivos.....20
2.3.1. Objetivo general 20
2.3.2. Objetivos específicos 20
2.4. Metodología utilizada.....21
2.4.1. Obtención del plásmido comercial pET-21b Pfluor-Betalac y el hospedero *E. Coli BL21 (DE3)* 21
2.4.2. Análisis Bioinformático de la enzima Betalactamasa 22
2.4.3. Transformación de la cepa *E. Coli BL21 (DE3)*.....22
2.4.4. Prueba de solubilidad de la enzima Betalactamasa posterior a la inducción de expresión proteica. 24
2.4.5. Protocolo de inducción de bacterias *E. Coli BL21 (DE3)* con IPTG ...24
2.4.6. Tratamiento de alícuotas de medios inducidos con IPTG. 25
2.4.7. Análisis de proteínas en fracción soluble / insoluble mediante electroforesis SDS PAGE. 25
2.4.8. Purificación enzimática por cromatografía de afinidad 26
2.4.8.2. Protocolo de purificación por cromatografía de afinidad con resina de Niquel para proteínas con cola de 6-His.....27
2.4.8.3. Cuantificación de la betalactamasa recombinante purificada mediante el método de Bradford.....28

2.8.9. Diálisis de betalactamasa purificada.....29
2.8.10. Ensayo cualitativo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante con rojo de fenol 30
2.8.11. Ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante para el cálculo de parámetros cinéticos. 31
2.5. Resultados 35
2.5.1. Análisis Bioinformático de la enzima Betalactamasa.....35
2.5.2. Transformación de la cepa *E. Coli BL21 (DE3)* 36
2.5.3. Prueba de solubilidad de la enzima Betalactamasa posterior a la inducción de expresión proteica 37
2.5.4. Purificación de la enzima betalactamasa mediante cromatografía de afinidad 39
2.5.5. Cuantificación de la betalactamasa recombinante purificada mediante el método de Bradford 41
2.5.6. Diálisis de la betalactamasa 46
2.5.7. Ensayo cualitativo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante con rojo de fenol. 46
2.5.8. Ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante para el cálculo de parámetros cinéticos. 46
2.6. Discusión 48
2.7. Conclusiones.....53
2.8. Recomendaciones 53
2.9. Bibliografía 54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de caldo y medio solido LB (Luria-Bertani) 24
Tabla 2. Concentraciones de IPTG evaluadas 25
Tabla 3. Preparación de soluciones patrón de BSA para la cuantificación de betalactamasa por el método de Bradford. 29
Tabla 4. Preparación de 1mL de solución de ensayo de actividad enzimática de betalactamasa recombinante 30
Tabla 5. Parámetros de ensayo enzimático con rojo de fenol en espectrofotómetro 31
Tabla 6. Soluciones de ensayo de actividad enzimática con rojo de fenol a diferentes concentraciones de ampicilina 32
Tabla 7. Soluciones de ensayo de actividad enzimática a diferentes concentraciones de ampicilina. 32
Tabla 8. Matriz de marco lógico planteado en proyecto de grado I. 33
Tabla 9. Parámetros bioquímicos calculados en ProtParam del ExPASy 35
Tabla 10. Concentración experimental calculada de patrones de BSA mediante la medida de A280. 42
Tabla 11. Valores calculados y medida de A595 para la cuantificación de betalactamasa por el método de Bradford. 42
Tabla 12. Valores de cuantificación de betalactamasa a partir de 2 mL de elución y 100 mL de cultivo *E. Coli BL21 (DE3).* 44
Tabla 13. Valores de absorbancia a 595 nm de soluciones patrón de BSA y betalactamasa.....44
Tabla 14. Valores de cuantificación de betalactamasa a partir de 1 mL de elución y 500 mL de cultivo *E. Coli BL21 (DE3).* 45
Tabla 15. Pendientes de las curvas en los primeros 90 segundos de reacción en el ensayo enzimático con rojo de fenol. 47

LISTA DE GRÁFICAS

Grafica 1. Curva de calibración para la cuantificación de betalactamasa por el método de Bradford con patrones de BSA. 43
Grafica 2. Curva de calibración para la cuantificación de betalactamasa por el método de Bradford con patrones de BSA. 45
Grafica 3. Ensayo de actividad enzimática con rojo de fenol a diferentes concentraciones de ampicilina a 423 nm. 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de antibióticos betalactámicos: (A) Penicilinas; (B) Cefalosporinas; (C) Carbapenemas (S.A. Sangare, 2015). 13
Figura 2. Acción de los antibióticos β –lactámicos (Gilman, op. Cit.; 2006). 14
Figura 3. Mecanismo de acción de las betalactamasas en el antibiótico penicilina. Hidrolisis del anillo betalactámico y posterior inactivación del antibiótico. 17
Figura 4. Mapa de restricción del vector comercial pET-21b(+) con el gen de betalactamasa clonado. 21
Figura 5. Protocolo de transformación bacteriana (Gee, 2016).....23
Figura 6. Partes de un gel de electroforesis SDS PAGE. 26
Figura 7. Placas de LB agar + ampicilina con bacterias *E. Coli BL21 (DE3)* transformadas. 36
Figura 8. Control positivo (derecho) y negativo (Izquierdo) de transformación bacteriana *E. Coli BL21 (DE3)*. 36
Figura 9. Prueba de solubilidad de betalactamasa recombinante (entre líneas punteadas) en un cultivo de *E. Coli BL21 (DE3)* inducido con 1mM de IPTG en tiempo 0, 6 y 19 horas (de derecha a izquierda). 38
Figura 10. Prueba de solubilidad de betalactamasa recombinante (entre líneas punteadas) en un cultivo de *E. Coli BL21 (DE3)* inducido con 0.4 mM de IPTG en tiempo 0, 6 y 19 horas (de izquierda a derecha). 38
Figura 11. Prueba de solubilidad de betalactamasa recombinante (entre líneas punteadas) en un cultivo de *E. Coli BL21 (DE3)* inducido con 0.2 mM de IPTG en tiempo 0, 6 y 19 horas (de derecha a izquierda). 39
Figura 12. Gel de electroforesis SDS PAGE para el seguimiento de inducción y purificación de la enzima betalactamasa recombinante, ubicada entre líneas punteadas (ver de izquierda a derecha), a partir de un cultivo de 100 mL de *E. Coli BL21 (DE3)* 40
Figura 13. Gel de electroforesis SDS PAGE para el seguimiento de inducción y purificación de la enzima betalactamasa recombinante, ubicada entre líneas punteadas (ver de izquierda a derecha). A partir de un cultivo de 500 mL de *E. Coli BL21 (DE3).* 40
Figura 14. Ensayo cualitativo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante con rojo de fenol.....46
Figura 15. Interacción entre residuos vecinos en la proteína con cola de histidinas y la matriz Ni-NTA. 50
Figura 16. Estructura química del imidazol e histidina. 51
Figura 17. Estructura química del rojo de fenol..... **¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE ANEXOS

Tabla 15. Preparación de gel de corrida de electroforesis SDS PAGE al 15% 56
Tabla 16. Preparación de gel de apilamiento de electroforesis SDS PAGE al 5%. 56

RESUMEN DEL TRABAJO

Debido a la importancia de las betalactamasas en el desarrollo de mecanismos antimicrobianos, el objetivo de este proyecto es realizar una caracterización cinética de la betalactamasa recombinante de *Pseudomonas fluorescens* mediante su producción en el organismo *E. Coli BL21(DE3)*, el cual se llevó a cabo actualmente en la Universidad Icesi. Para esto, se transformaron bacterias *E. Coli BL21 (DE3),* con el plásmido pET21b- Pfluor-Betalac el cual contiene el gen de interés que codifica por la betalactamasa. Posteriormente, se extrajó y se purificó la betalactamasa recombinante por medio de cromatografía de afinidad con resina de níquel, y por último se realizó ensayos cualitativos y cuantitativos de actividad enzimática con rojo de fenol, además se deseó determinar los parámetros cinéticos de reacción enzimática de la betalactamasa aislada, como la constante de Michaelis (K_M) y la velocidad máxima de catálisis (V_{max}), empleando ampicilina como sustrato.

Se realizó un estudio bioinformático de la betalactamasa mediante su secuencia de aminoácidos y se calculó su peso molecular (39.7KDa), su punto isoeléctrico (6.73) y coeficiente de extinción molar ($44810 M^{-1}cm^{-1}$) en ExPASy. Se obtuvo colonias transformadas *E. Coli BL21(DE3)* mediante choque térmico, y posteriormente se hizo la inducción con diferentes concentraciones de IPTG (1, 0.4 y 0.2 mM). El análisis electroforético de contenido proteico muestra que a las 19h de inducción con 0.2mM de IPTG, la enzima se encuentra en mayor proporción en la fracción soluble y se concluye que es el tiempo óptimo de expresión. Fue posible la purificación de la enzima a partir de 500 mL de cultivo con baterías *E. Coli BL21(DE3)* transformadas, mediante cromatografía de afinidad con resina de níquel. Se cuantificó la betalactamasa obtenida por el método de Bradford y se calculó una concentración de 1,232 µM a partir de 100 mL de cultivo y 37.80 µM a partir de 500 mL de cultivo.

Por último, se realizó los ensayos de actividad enzimática con rojo de fenol, donde colorimétricamente se observó la actividad de la enzima purificada debido a la hidrolisis del sustrato ampicilina. Sin embargo, en los ensayos cuantitativos se observó actividad pero las curvas obtenidas no tuvieron un comportamiento consistente para calcular los parámetros de cinética. Se espera que con estos estudios preliminares se pueda escalar el proceso de producción de betalactamasa y diseñar un método adecuado para el cálculo de sus parámetros cinéticos.

Palabras Clave: Betalactamasa, caracterización cinética, cromatografía de afinidad, *pseudomonas fluorescens*.

ABSTRACT

Due to the importance of betalactamases in the development of possible antimicrobial mechanisms, the objective of this project is to carry out a kinetic characterization of the recombinant beta-lactamase of Pseudomonas fluorescens through this production in the organism *E. coli BL21 (DE3)* which was carried out at the Icesi university. For this one, transformed bacteria were obtained from *E. coli BL21 (DE3*), using a pET21b-Pfluor-Betalac plasmid with the gene of interest encoding the expression of betalactamase. Subsequently, the recombinant betalactamase was extracted and purified by a nickel resin affinity chromatography, and finally qualitative and quantitative enzyme activity assays were performed with phenol red. In addition, it was desired to determine the kinetic parameters of the enzymatic reaction of the Isolated beta lactamase, such as the Michaelis constant (K_M) and the maximum rate of catalysis (V_{max}), using ampicillin as a substrate.

A bioinformatic study of betalactamase was performed by the amino acid sequence and the molecular weight (39.7KDa), isoelectric point (6.73) and molar extinction coefficient ($44810 M^{-1}cm^{-1}$) in ExPASy were calculated. *E. Coli BL21 (DE3)* transformed colonies were obtained by thermal shock test, and the induction was done with different concentrations of IPTG (1, 0.4 and 0.2 mM). The electrophoretic analysis of protein shows that at 19h of induction with 0.2mM of IPTG, the enzyme is found in greater proportion in the soluble fraction and it is concluded that it is the optimal time of expression. Purification of the enzyme from 500 mL of culture with transformed *E. coli BL21 (DE3)* bacterials was possible by affinity chromatography with high purity. The beta-lactamase obtained was quantified by the Bradford method and obtained a concentration of 1.232 µM from 100 mL of culture and 37.80 µM from 500 mL of culture.

Finally, the enzymatic activity assays were performed with phenol red, it was colorimetrically observed the activity of the purified enzyme due to the hydrolysis of the ampicillin substrate. However, in the quantitative activity tests, enzymatic activity was observed but the curves obtained did not have a consistent behavior to calculate the kinetic parameters. It is expected that with these preliminary studies the process of production of betalactamase can be scaled and a suitable method for calculating its kinetic parameters can be designed.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los antibióticos sigue siendo uno de los avances en medicina moderna (Rice, 2008). Los antibióticos han salvado incontables vidas y siguen siendo un pilar de la terapia para Infecciones bacterianas. El éxito clínico del primer betalactámico, Penicilina G, provocó la búsqueda y desarrollo de derivados adicionales. Esta búsqueda dio lugar a los antibióticos betalactámicos en uso clínico hoy en día (penicilinas, Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámico y carbapenems (Babic M. A., 2006). Las características comunes de estas clases de antibióticos es el anillo lactamico de cuatro miembros el cual es esencial para su actividad antimicrobiana, debido a que pueden unirse a las proteínas de unión a penicilina de las bacterias implicadas en la síntesis de la pared celular y por lo tanto inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana (S.A. Sangare, 2015). Desafortunadamente, las enzimas betalactamasas, que son un mecanismo de resistencia bacteriana, surgieron como una amenaza clínica significativa para estas drogas. En respuesta a este desafío, dos estrategias fueron avanzado para preservar la utilidad de los antibióticos betalactámicos: (i) descubrir o diseñar antibióticos betalactámicos que sean capaces de evadir bacterias por medio de la inactivación enzimática conferida por las betalactamasas, o (ii) inhibir las betalactamasas para que el betalactámico pueda alcanzar las proteínas de unión a proteínas (PBPs), que son la diana de los antibióticos betalactámicos (Sarah M. Drawz, 2010).

La presencia de los antimicrobianos causa que los microorganismos se adapten a estos por la evolución de mecanismo de resistencia. Un ejemplo de ello, es la producción de betalactamasas que es un mecanismo de resistencia bacteriana. Las betalactamasas son enzimas capaces de inactivar los antibióticos de la familia betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos). Estos antibióticos o antimicrobianos fueron los más utilizados en los últimos años debido a su amplio espectro y baja toxicidad. Estos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de los peptidoglucanos de la pared celular bacteriana lo que causa la muerte celular. Por otro lado, las betalactamasas actúan hidrolizando los anillos betalactámicos de estos antibióticos y de esta manera confieren la resistencia bacteriana.

El crecimiento de la problemática de resistencia bacteriana se ve en aumento debido al incremento de antimicrobianos que causa que los microorganismos se adapten a estos por la evolución de mecanismos de resistencia. Debido a la importancia de las potenciales aplicaciones de las betalactamasas en el desarrollo de posibles mecanismos antimicrobianos, el objetivo de este proyecto es realizar una caracterización cinética de la betalactamasa recombinante de *Pseudomonas fluorescens* mediante su producción en el organismo *E. Coli BL21(DE3).*

Con la producción de la enzima, se quiere contribuir al desarrollo de ensayos inhibitorios de la misma, proporcionando la enzima con sus parámetros cinéticos calculados y su actividad catalítica totalmente descrita y verificada, para que sea

una manera más sencilla de obtener la enzima funcional para los investigadores, evitando costos en la compra de betalactamasa y tiempos muertos de espera en el envío de la misma, además de brindar cantidad suficiente para los ensayos. Con lo anterior, se busca contribuir a la solución de la problemática que presenta actualmente a nivel nacional y mundial, la resistencia bacteriana debido a que se registran gran número de infecciones hospitalarias causadas por microorganismos asociados a altas tasas de resistencia.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

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

Desde la introducción de la penicilina en el mercado, estos antibióticos y sus derivados han sido los agentes antimicrobianos de mayor elección. Desafortunadamente, su eficacia ha sido contrarrestada por las betalactamasas bacterianas. Los microorganismos patógenos, generalmente los Gram negativos, producen estas enzimas que les confieren resistencia frente a los antibióticos betalactámicos; además se ha identificado la actividad limitada de los inhibidores enzimáticos, así que una posibilidad de combatir la resistencia bacteriana es mediante el diseño de nuevos fármacos. De acuerdo a lo anterior, se quiere contribuir al desarrollo de posibles inhibidores o mecanismos antimicrobianos mediante la caracterización cinética de betalactamasa recombinante producida en el organismo hospedero *E. Coli BL21(DE3).*

Evolutivamente los microorganismos han desarrollado mecanismos eficaces para evadir los blancos de acción de los antibióticos, como es el caso de las bacterias productoras de betalactamasas, ya que estas enzimas destruyen la integridad estructural de los antibióticos derivados de la penicilina (Babic, Hujer, & Bonomo, 2006). Su función es hidrolizar el anillo betalactámico de los antibióticos, y desactivar de esta manera las propiedades antimicrobianas de la molécula. En consecuencia, es un reto para la comunidad científica descubrir nuevos inhibidores de estas enzimas o mecanismos para evitar la desactivación del antibiótico. Por lo tanto, en este proyecto de grado se produjo una betalactamasa recombinante clonada de *Pseudomona fluorescens* en el plásmido comercial pET y se determinaron sus parámetros cinéticos de reacción enzimática, para finales del año 2016. Con este proyecto se buscó brindar la fácil adquisición de esta enzima para futuras investigaciones en la universidad Icesi, que involucren ensayos con posibles inhibidores o polímeros que eviten su actividad enzimática.

Con el objetivo de verificar la actividad catalítica de la enzima purificada por cromatografía de afinidad, es necesario realizar estudios de cinética enzimática utilizando ampicilina como sustrato y calcular las constantes cinéticas de velocidad máxima (V_{Max}) y constante de afinidad o más conocida como la constante de Michaelis-Mentes (K_m). Estos parámetros cinéticos describen el comportamiento catalítico de la enzima purificada, el cual se ajusta al modelo descrito por Michaelis y Menten, donde la actividad cinética de la betalactamasa obtenida se caracteriza por el aumento de la velocidad catalítica en función del aumento de las concentraciones de ampicilina hasta llegar a la etapa de saturación de la enzima, en la cual se alcanza la velocidad máxima de reacción y que permanece constante ante el aumento de las concentraciones de sustrato (Lejeune, Vanhove, & Matagne, 2001).

De acuerdo con los resultados de actividad catalítica de la betalactamasa recombinante producida, se pueden hacer futuros ensayos inhibitorios de la misma para comprobar el potencial inhibitorio de fármacos candidatos o evaluar matrices poliméricas anfifílicas que eviten la degradación del antibiótico betalactámico. Además, se puede comparar los valores de parámetros cinéticos al medirlos con la enzima inhibida junto con la ampicilina para observar cómo estos se ven afectados por la presencia de algún inhibidor. Por consiguiente, con la producción de la enzima en la universidad Icesi se quiere contribuir al desarrollo de estos ensayos inhibitorios, proporcionando la enzima con sus parámetros cinéticos calculados y su actividad catalítica totalmente descrita y verificada, para que sea una manera más sencilla de obtener la enzima funcional para los investigadores, evitando costos en la compra de betalactamasa y tiempos muertos de espera en el envío de la misma. Además, brindar cantidad suficiente para los ensayos, ya que es más factible expresarla mediante el plásmido que comprarla cada vez que se requiera.

Este proyecto de grado resulta de gran interés debido a la prevalencia mundial y en nuestro país de infecciones hospitalarias causadas por microrganismos asociados a altas tasas de resistencia. Existen microorganismos patógenos, como *E. cloacae*, con la capacidad de producir por vía cromosómica o constitutiva betalactamasas de clase C (cefalosporinasas) y, por esta razón, han desarrollado resistencia frente a los fármacos betalactámicos. Varios estudios recientes realizados en Colombia han encontrado altas tasas de resistencia para este microorganismo. Asimismo, los estudios realizados por parte del Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibióticos en Medellín (GERMEN) entre los años 2010 y 2012 revelaron porcentajes de resistencia frente a la combinación de piperacilina y tazobactam superiores a 40 % en los servicios de las unidades de cuidados intensivos y otras salas de las instituciones hospitalarias que hacen parte de la red (Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibioticos en Medellín (GERMEN), 2013).

Esta problemática también se evidencia en Europa, como se ve en el informe del European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), donde se observó un aumento significativo en la resistencia a cefalosporinas de tercera generación debido al aumento de las BLEE (Betalactamasas de espectro extendido) (del 2,8% en 2006 al 4,3% en 2007), tendencia que continuó en 2008 (Díaz, Hernández, Martínez-Martínez, A, & (GEIH), 2009). Es de suma importancia la investigación sobre los mecanismos de resistencia bacterianos ya que es una problemática mundial que afecta la salud a millones de personas, y cada día deben buscarse nuevos inhibidores y antibióticos para contrarrestar la actividad microbiana en la salud.

2.2. Marco teórico y estado del arte

La investigación de Louis Pasteur y de Robert Koch (Koch, 1876; Pasteur, 1861) propuso la teoría microbiana de las enfermedades, que vinculó la existencia de microorganismos específicos con enfermedades precisas. La quimioterapia actual contra estas enfermedades tiene su cimiento en tales ideas que fueron radicales para su época. La teoría en cuestión logró identificar y definir muchos microbios patógenos y sus mecanismos para causar enfermedades, con esto se introdujeron los antimicrobianos. Con el empleo de estos últimos se tuvieron en cuenta varios factores importantes como la administración de regímenes apropiados, la resistencia a fármacos, las interacciones farmacológicas y los efectos tóxicos. Los antimicrobianos constituyen un gran grupo de compuestos con estructuras diversas y miles de mecanismos de acción contra bacterias, virus, hongos y parásitos (Gilman, 2006)

La presencia de los antimicrobianos causa que los microorganismos se adapten a estos por la evolución de mecanismo de resistencia. Un ejemplo de ello, es la producción de betalactamasas que es un mecanismo de resistencia bacteriana. Las betalactamasas son enzimas capaces de inactivar los antibióticos de la familia betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos). Estos antibióticos o antimicrobianos fueron los más utilizados en los últimos años debido a su amplio espectro y baja toxicidad. El esqueleto básico común de los antibióticos lactámicos es un anillo de cuatro miembros (2-azetidinona), el cual es esencial para su actividad antimicrobiana, debido a que pueden unirse a las proteínas de unión a penicilina de las bacterias implicadas en la síntesis de la pared celular y por lo tanto inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana (S.A. Sangare, 2015). Los principales tipos son penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas se muestran en la figura 1.

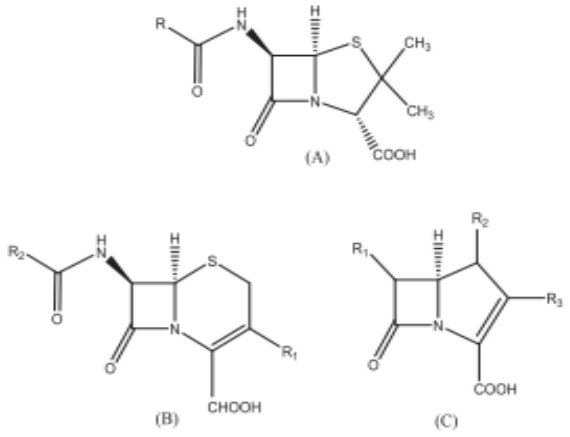


Figura 1. Estructura química de antibióticos betalactámicos: (A) Penicilinas; (B) Cefalosporinas; (C) Carbapenemas (S.A. Sangare, 2015).

2.2.1. Mecanismo de acción de los antibióticos β –lactámicos

Los antibióticos β –lactámicos son antimicrobianos útiles recetados y administrados a menudo que comparten una estructura y un mecanismo de acción comunes: la inhibición de la síntesis de peptidoglucanos de la pared celular bacteriana. En este grupo están las penicilinas, las cefalosporinas y los carbapenémicos.

La resistencia bacteriana contra los β -lactámicos sigue en aumento con un ritmo impresionante. Los mecanismos de resistencia comprenden no sólo la generación de β -lactamasas, que en algunos casos destruyen todos los antibióticos β-lactámicos, sino también alteraciones o la adquisición de nuevas proteínas de unión a la penicilina (*PBP; penicillin-binding proteins*) y disminución de la penetración del antibiótico, de la expulsión activa del mismo o ambas características. Se puede decir, que innumerables infecciones intrahospitalarias por bacterias gramnegativas son resistentes a todos los fármacos de esta clase, por el creciente aumento de la resistencia bacteriana.

Los antibióticos β -lactámicos destruyen bacterias susceptibles. Es incompleto el conocimiento de sus mecanismos de acción, pero innumerables investigadores han aportado datos que permiten entender el fenómeno básico (Bayles, 2000). La pared de la bacteria es esencial para su crecimiento y desarrollo normal. Los peptidoglucanos son componentes heteropoliméricos de dicha pared que le confieren estabilidad mecánica rígida, gracias a su estructura enrejada con innumerables enlaces cruzados (figura 2). En los microorganismos grampositivos la pared tiene 50 a 100 moléculas de espesor, pero en las bacterias gramnegativas solamente tiene una o dos moléculas de grosor. El peptidoglucano está compuesto de cadenas de glucano que son cordones lineales con dos aminoazúcares alternantes (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico) que establecen enlaces cruzados con cadenas de péptidos (Gilman, *op. Cit.;* 2006).

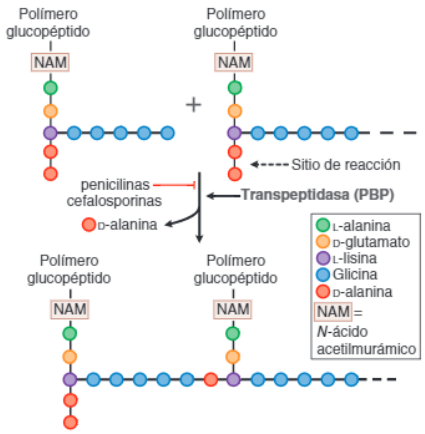


Figura 2. Acción de los antibióticos β –lactámicos (Gilman, op. Cit.; 2006).

La biosíntesis de los peptidoglucanos se puede dividir en tres etapas. La primera ocurre en el citoplasma. El producto, difosfato de uridina (UDP)-

acetilmuramilo-pentapéptido se acumula en las células cuando se inhiben las siguientes etapas de síntesis. La última reacción en la síntesis de dicho compuesto es la adición de un dipéptido, la d-alanil-d-alanina. La síntesis de este último incluye la racemización previa de la l-alanina y la condensación catalizada por la d-alanil-d-alanina sintasa. La d-cicloserina es un análogo estructural de d-alanina y actúa como inhibidor competitivo de la racemasa y la sintasa. Durante las reacciones de la segunda etapa, UDP-acetil-muramil-pentapéptido y UDP-acetilglucosamina se unen (con la separación y liberación de nucleótidos uridínicos) para formar un largo polímero. La tercera etapa final consiste en completar los enlaces cruzados, cosa que se obtiene por medio de las peptido-glucano glucosiltransferasas fuera de la membrana de las bacterias grampositivas y dentro del espacio periplásmico en las gramnegativas. El residuo glicínico terminal del puente de pentaglicina se une al cuarto residuo del pentapéptido (d-alanina) y libera el quinto residuo (también d-alanina) (figura 2). Precisamente esta última etapa de la síntesis de peptidoglucano es la que inhiben los antibióticos β -lactámicos y antibióticos glucopéptidos como la vancomicina (por un mecanismo diferente del de los β –lactámicos). Los modelos estereoscópicos indican que la conformación de la penicilina es muy similar a la de d-alanil-d-alanina. La transpeptidasa probablemente es acilada por la penicilina, es decir, al parecer se forma la enzima peniciloil, con rotura del enlace —CO—N— del anillo β-lactámico. A pesar de que la actividad de transpeptidasa ha sido el elemento en el que actúan las β-lactámicos y la vancomicina, la glucosiltransferasa es un sitio relativamente no explorado de acción de antibióticos (Lovering, 2007).

La inhibición de la transpeptidasa descrita es innegablemente importante, pero hay sitios de acción adicionales, vinculados con las acciones de las penicilinas y las cefalosporinas colectivamente llamados proteínas de unión a la penicilina (PBP, penicillin-binding-proteins). Las PBP varían en su afinidad por diversos antibióticos β-lactámicos, a pesar de que las interacciones finalmente se tornan covalentes. Las PBP de mayor peso molecular de *E. coli* (PBP 1a y 1b) incluyen las transpeptidasas encargadas de la síntesis del peptidoglucano. La inhibición de las transpeptidasas hace que se formen esferoplastos y que surja la lisis rápida. Sin embargo, la inhibición de las actividades de otras PBP puede hacer que se retrase la lisis (PBP 2) o se produzcan formas filamentosas largas de la bacteria (PBP 3). La letalidad de la penicilina contra la bacteria al parecer comprende los mecanismos lítico y no lítico. La pérdida del equilibrio entre el ensamblado de peptidoglucano mediado por PBP y la actividad de la hidrolasa mureína (todo causado por la penicilina) ocasiona autólisis. La destrucción no lítica por parte de la penicilina puede abarcar proteínas similares a la holina en la membrana bacteriana, que colapsan el potencial de membrana (Bayles, *op. cit*; 2000).

2.2.2. Mecanismo de acción de las betalactamasas

Existen cuatro mecanismos principales por los cuales las bacterias pueden resistir los antibióticos lactámicos. Uno de ellos es la producción de enzimas betalactamasa que es el mecanismo más común e importante de la resistencia en las bacterias Gram- negativas.

La primera enzima betalactamasa fue identificada en *Escherichia coli* antes que el uso clínico de la penicilina. En un documento centinela publicado hace casi 70 años, E. P. Abraham y E. Chain, describe la *B. coli* "penicilinasa". La enzima no parecía ser clínicamente relevante, ya que la penicilina era dirigida al tratamiento para las infecciones de *estafilococos* y *estreptococos*. Por lo tanto, Abraham, Chain y sus colegas fueron capaces de aislar la enzima a partir de estos organismos Gram-positivos.

Cuatro años más tarde, Kirby extrajo con éxito estas células "inactivadoras de penicilina" de *Staphylococcus aureus*, que posteriormente presentaron la aparición de un problema clínico significativo. El número cada vez mayor de antibióticos β-lactámicos ha aumentado la presión selectiva sobre las bacterias, promoviendo la supervivencia de los organismos con múltiples β -lactamasas. En la actualidad, se identifican más de 850 β- lactamasas. Se especula que una alta tasa de replicación y una frecuencia de mutación alta cause que estas bacterias se adapten a los nuevos β-lactámicos por la evolución de estas β –lactamasas (Sarah M. Drawz, 2010).

Las betalactamasas pueden inactivar algunos de tales fármacos y aparecer en grandes cantidades. Microorganismos diversos elaboran diferentes β -lactamasas, si bien muchas bacterias producen sólo una forma de la enzima. Las especificidades por sustratos de algunas de las enzimas son relativamente bajas, y a menudo se describen bajo el nombre de penicilinasas o cefalosporinasas. Otras enzimas de “espectro extendido” hidrolizan diversos antibióticos β -lactámicos. Las β-lactamasas se agrupan en cuatro clases: de A a D. Las de la clase A incluyen las β-lactamasas de espectro extendido (ESBL, extended-spectrum β-lactamases) que degradan las penicilinas, algunas cefalosporinas y en algunas situaciones, carbapenémicos. Algunas enzimas de clases A y D son anuladas por los inhibidores de β-lactamasa antes mencionados. Las β-lactamasas de clase B son enzimas que dependen del zinc y que destruyen todos los β-lactámicos, excepto el aztreonam, en tanto que las β-lactamasas de clase C son activas contra las cefalosporinas. La clase D comprende enzimas que degradan la cloxacilina (Bush, 2001; Jacoby y Munoz-Price; Walsh, 2008).

En las bacterias gramnegativas aparecen las β-lactamasas en cantidades relativamente pequeñas, pero están situadas en el espacio periplásmico entre las membranas interna y externa del microorganismo. Las enzimas para la síntesis parietal están en la cara externa de la membrana interna, razón por la cual estas β-lactamasas están situadas estratégicamente para protección máxima del microorganismo. Las β-lactamasas de bacterias gramnegativas están

codificadas en cromosomas o en plásmidos, y pueden ser de tipo constitutivo o inducible. Los plásmidos se pueden transferir entre una y otra bacterias por medio de conjugación. Las enzimas en cuestión hidrolizan penicilinas, cefalosporinas o ambos fármacos[8] (Walsh, 2008) (Bush, 2001) (Jacoby y Munoz-Price, 2005). Sin embargo, no hay una relación constante entre la susceptibilidad de un antibiótico a la inactivación por una β-lactamasa, y la capacidad de dicho fármaco para destruir al microorganismo.

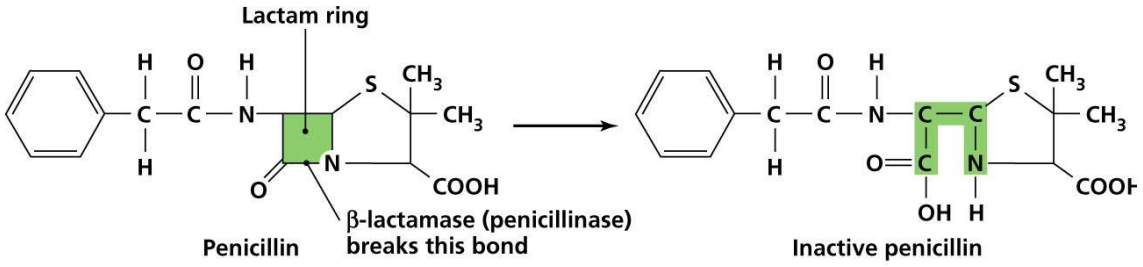


Figura 3. Mecanismo de acción de las betalactamasas en el antibiótico penicilina. Hidrolisis del anillo betalactámico y posterior inactivación del antibiótico.

El aumento de la resistencia bacteriana es un hecho evidente a la vez que un problema antiguo y aun cuando haya nuevos antibióticos disponibles, la presencia de microorganismos multirresistentes es cada vez más frecuente. Es preciso actuar de forma coordinada para reducir en lo posible la aparición y propagación de resistencias a los antimicrobianos. Debido a lo anterior, es de interés para los científicos hacer ensayos sobre la actividad de la enzima y su caracterización cinética para posteriormente encontrar una inhibición de su actividad y futuros fármacos que puedan contribuir a solucionar la problemática de salud que se genera a partir de esto.

2.2.3. Cinética enzimática de las enzimas betalactamasas

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima. Con esto al medir la cinética de las β- lactamasas se pueden encontrar posibles inhibidores y comprobar el potencial inhibitorio de fármacos candidatos o evaluar matrices poliméricas anfifílicas que eviten la degradación del antibiótico betalactámico. Para este fin se puede comparar los valores de parámetros cinéticos al medirlos con la enzima inhibida junto con la ampicilina para ver cómo estos se ven afectados por la presencia de inhibidor.

Las betalactamasas tipo serina acilan los antibióticos betalactámicos, y luego mediante moléculas de agua lo hidrolizan. De esta manera las betalactamasas pueden inactivar los antibióticos, donde la reacción enzimática se muestra en la ecuación 1.

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} E{:}S \xrightarrow{k_2} E - S \xrightarrow{k_3,\ H_2O} E + P \qquad (1)$$

En este esquema de reacción, **E** representa la enzima betalactamasa, **S** es el sustrato antibiótico, **E:S** es el complejo de Michaelis, **E-S** es la acil enzima y **P** es el producto desprovisto de actividad antibacterial.

Con la producción de esta enzima se busca contribuir al desarrollo de estos ensayos inhibitorios, proporcionando la enzima con sus parámetros cinéticos calculados y su actividad catalítica totalmente descrita y verificada, esto hace que se contribuya a la gran problemática actual que se tiene por la evolución de estas enzimas que presenta resistencia a los antibióticos lactámicos.

Para realizar el proceso, primero se debe producir la enzima de manera recombinante. En este caso, se realiza un proceso de competencia celular en la bacteria *E. Coli BL21 (DE3)* y seguido de esto el proceso de transformación bacteriana con el plásmido pET-21b(+) que contiene el gen de interés que codifica para la β-lactamasa. Posteriormente, se induce la expresión del gen de betalactamasa clonada en el vector pET-21b(+) para su posterior extracción celular, mediante cromatografía de afinidad, utilizando una resina de Níquel; este proceso se sigue mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). En segundo lugar, se determina la actividad catalítica y la determinación de los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de la enzima betalactamasa obtenida en el laboratorio mediante cromatografía de afinidad se mide por medio de ensayos espectrofotométricos. Finalmente, se obtiene la enzima para su posterior determinación de parámetros cinéticos como herramienta para futuras investigaciones, que buscan solucionar el problema de resistencia bacteriana.

2.2.4. Otras investigaciones

Debido a que la 51 Asamblea Mundial de la Salud declaró la resistencia a los antimicrobianos como una amenaza para la humanidad (Resolución WHA51.17, 1998), la Organización Mundial de la Salud (OMS) adopto medidas y estrategias de prevención y control para contener el crecimiento de este evento que cada vez deja menos opciones terapéuticas disponibles. De otro lado, las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) representan otra amenaza creciente. Estos dos eventos tienen un impacto negativo sobre la salud prolongando el tiempo de hospitalización, aumentando el riesgo de muerte, y elevando los costos para el paciente y para el sistema de salud.

Desde 2002, CIDEIM, entendiendo la necesidad de conocer la magnitud del problema de resistencia bacteriana en Colombia y atendiendo las recomendaciones de OMS, conforma la primera red de hospitales a nivel nacional para el estudio de la resistencia bacteriana en Gram negativos (CIDEIM, 2016).

Estudios recientes muestran cifras tomadas de la Organización Mundial de la Salud donde la prevalencia combinada de infecciones hospitalarias en todo el hospital entre 1995 y 2010 en los países de bajos y medianos ingresos fue de 10,1 por cada 100 pacientes (95% intervalo de confianza [IC]: 8.4-12.2), que se compara desfavorablemente con la tasa correspondiente en los países de ingresos altos (7,6 episodios por 100 pacientes; IC del 95%, 6.9 a 8.5 (Organization, 2011). Este estudio muestra que la mayoría de infecciones hospitalarias en los países desarrollados y en desarrollo son por bacterias Gram-negativas, predominando las especies y subespecies de la familia *Enterobacteriaceae* (Benedetta Allegranzi, 2011).

Las betalactamasas de espectro extendido (ESBL) pueden conferir resistencia a las penicilinas de primera y segunda generación y cefalosporinas de tercera generación, y aztreonam que son generalmente inhibidas por los inhibidores de la β-lactamasa como el ácido clavulánico (Manuel Guzmán Blanco, 2014). La mayoría de ESBL también puede hidrolizar cefalosporinas de cuarta generación (por ejemplo, cefepime o cefpiroma). De este modo, las infecciones por estos patógenos resistentes a múltiples fármacos son una importante amenaza para la salud pública, ya que hay opciones de tratamiento limitadas disponibles. Por lo tanto, el grupo de investigación CIDEIM y otros grupos buscan proporcionar solución a este problema mediante ensayos investigativos y datos de la epidemiología actualizada de productores de ESBL *enterobacterias* en el ámbito hospitalario de América Latina, con un enfoque en la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* cepas de toda la región.

El nuevo conocimiento generado proporciona evidencia para que los comités de infecciones diseñen estrategias y medidas de control eficientes y eficaces para la contención de la resistencia bacteriana. Así mismo, la realización de eventos académicos internacionales ofrece a la comunidad científica la oportunidad de actualizarse en el nuevo conocimiento generado en el mundo.

Finalmente, Este proyecto de grado resulta de gran interés debido a la prevalencia mundial y en nuestro país de infecciones hospitalarias causadas por microorganismos asociados a altas tasas de resistencia**.** Por esto, se busca por medio de este dar solución a la problemática creciente de la resistencia a nivel local en la Universidad Icesi, por medio de la proporción de datos cinéticos de la enzima betalactamasa utilizada como mecanismo de resistencia bacteriana, para que otros grupos de investigación elaboren posibles mecanismo de inhibición para esta enzima.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Realizar la caracterización cinética de la betalactamasa de *Pseudomonas fluorescens,* producida de forma recombinante en bacterias *E. Coli BL21(DE3),* empleando como sustrato ampicilina, para finales del año 2016 en la universidad Icesi.

2.3.2. Objetivos específicos

Emplear herramientas bioinformáticas, para analizar la secuencia de nucleótidos de la enzima betalactamasa de *P. fluorescens*.

Transformar bacteria *E. Coli BL21 (DE3),* con un plásmido comercial pET-21b Pfluor-Betalac que contiene el gen de interés.

Extraer y purificar la betalactamasa producida en *E. Coli BL21 (DE3),* por la técnica de cromatografía de afinidad mediante una resina de níquel comercial.

Determinar los parámetros cinéticos de reacción enzimática de la betalactamasa recombinante aislada, como la constante de Michaelis (K_m) y la velocidad máxima de catálisis (V_{max}) frente al sustrato ampicilina.

CLÁUSULA: De acuerdo a la extensión y al número de integrantes que elaboran este proyecto de grado (dos estudiantes), se quiere lograr todos los objetivos anteriormente expuestos en el tiempo estipulado (cinco meses aproximadamente). Sin embargo, por el grado de dificultad es posible que no se logre la caracterización cinética de la enzima betalactamasa, por esta razón, se quiere asegurar la purificación de la enzima y comprometernos a un trabajo arduo en el laboratorio para lograr todo lo propuesto hasta este objetivo (tercer objetivo) y si es posible la caracterización cinética de la enzima.

2.4. Metodología utilizada

El proyecto de grado se realizó en la Universidad Icesi, en el lugar de trabajo asignado para el grupo de investigación de Bioquímica. Con la siguiente metodología propuesta se pretende obtener resultados coherentes para la realización y el logro de cada objetivo planteado.

2.4.1. Obtención del plásmido comercial pET-21b Pfluor-Betalac y el hospedero *E. Coli BL21 (DE3)*

El gen que codifica la expresión de la betalactamasa de *P. fluorescens* fue sintetizado e introducido en el vector de clonación pET-21b Pfluor-Betalac por Biomatik. El gen fue sintetizado de acuerdo a la siguiente secuencia de aminoácidos enviada, correspondiente a la betalactamasa deseada y el mapa de restricción del plásmido obtenido se encuentra en la figura 4.

Name: P. FluorBlac

MATDIRQVVDS TVEPLMQQQD IAGLSVAVIQ NGKAQYFNYG
VANKDSKQPITENTLFEIGS VSKTFTATLA GYALANGKLK LSDPASQYLP
ALRGDKFDHISLLNLGTYTA GGLPLQFPEE SDNTGKMISY YQHWKPAFAPG
TQRLYSNPSIGLFGHLAAQ SLGQPFEKLM EQTVLPKLGL KHTFISVPET
QMSLYAQGYDKAGKPVRVSPGAL DAEAYGI KTSTSDLIHY VEVNMHPAKL
EKPLQQAIAATHTGYYTVDG MTQGLGWEMY PYPIKVDALVEGN STQMAME
PHKVNWLTPPQAAPLDTLVN KTGSTGGFGA YVAYVPSKGL
GVVILANKNYPNAERVKAAHAIL SAMDQHHHHHH*

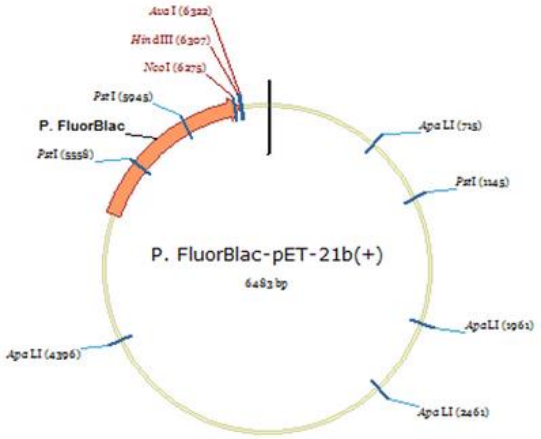


Figura 4. Mapa de restricción del vector comercial pET-21b Pfluor-Betalac con el gen de betalactamasa clonado.

El plásmido comercial tuvo un pretratamiento antes de su uso. En primer lugar, Antes de abrir el tubo que contiene el plásmido, se centrifugó brevemente, debido que el plásmido liofilizado podría unirse a la pared del tubo. La apertura sin centrifugación podría causar la pérdida del ADN. El vector se conserva en buffer TE a - 20°C.

Por otra parte, las células de *E. Coli BL21 (DE3)* se encuentran en el laboratorio de investigación de Bioquímica. Esta cepa comercial contiene el bacteriófago lambda DE3. Este lisógeno λDE3 contiene los siguientes elementos (Novagen, 2006):

- El gen lacI que codifica el represor lac
- El gen de la ARN polimerasa T7, bajo el control del promotor lacUV5
- Una pequeña porción del gen lacZ.

Las células competentes de esta cepa comercial se guardan a - 80°C.

2.4.2. Análisis Bioinformático de la enzima Betalactamasa

Se realizó un análisis bioinformático de la betalactamasa de *P. fluorescens*. De acuerdo a la secuencia de nucleótidos del gen que la codifica en el plásmido comercial, se puede determinar los principales parámetros bioquímicos de la enzima, como su secuencia de aminoácidos, peso molecular y punto isoeléctrico mediante las herramientas bioinformáticas contenidas en ExPASy (Carrasco & Sandoval, 2015). Con esta información acerca de la enzima se puede plantear parámetros y condiciones experimentales para su obtención, purificación y caracterización cinética.

Para comprobar que el gen sintetizado por Biomatik concuerda con la secuencia de aminoácidos planteada anteriormente, se utilizó un software online de traducción reversa (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html), y la secuencia de nucleótidos obtenida se comparó con la clonada en el plásmido comercial, las cuales correspondieron en sus secuencias. Para determinar los principales parámetros bioquímicos de la betalactamasa se empleó la herramienta ProtParam del ExPASy (http://web.expasy.org/protparam/).

2.4.3. Transformación de la cepa *E. Coli BL21 (DE3)*

La transformación consiste en el principio de adquisición de información genética en bacterias mediante la introducción de DNA plasmídico. Se requieren bacterias competentes *E. Coli BL21 (DE3)* obtenidas por tratamiento químico con cloruro de calcio. Por otra parte, es necesario la utilización del vector pET, debido a que es el sistema más poderoso desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en organismos *E. Coli* y está bajo un estricto control mediante el promotor T7 de bacteriófago (Novagen, *op. Cit,* 2006).

Se llevó a cabo el método de transformación bacteriana mediante choque térmico, donde el vector empleado, en este caso 50 ng (0,24uL) del pET-21b Pfluor-Betalac, se mezcla en un tubo eppendorf junto con las células competentes *E. Coli BL21 (DE3)* y luego se introduce en hielo durante 10 minutos. Se conoce que se ha de mantener las células en frio ya que el ADN se mantiene en la superficie externa de la bacteria y el frio promueve la generación de huecos en la estructura lipídica de la membrana para el ingreso del ADN.

Posteriormente, las células se calientan 1 minuto aproximadamente a 42°C. Durante este breve choque térmico el ADN entra a la célula, porque el intercambio de calor dentro de la célula arrastra el ácido nucleico consigo. Se seguirá el protocolo establecido en la figura 5, utilizando un medio selectivo LB agar con ampicilina para la siembra de 150 µL de células transformadas en cada placa y su posterior incubación y almacenamiento en la nevera de 4 °C. Lo anterior, se hizo por triplicado para tener células frescas y en buen estado para los protocolos posteriores. Además, se realizan controles negativos y positivos de transformación bacteriana para descartar cualquier error en el proceso. Se llevará a cabo un control negativo, donde se cultivan las bacterias *E. Coli BL21 (DE3)* en placas LB junto con ampicilina y por otra parte, se prepara un control positivo, sembrando en placas LB las células mencionadas.

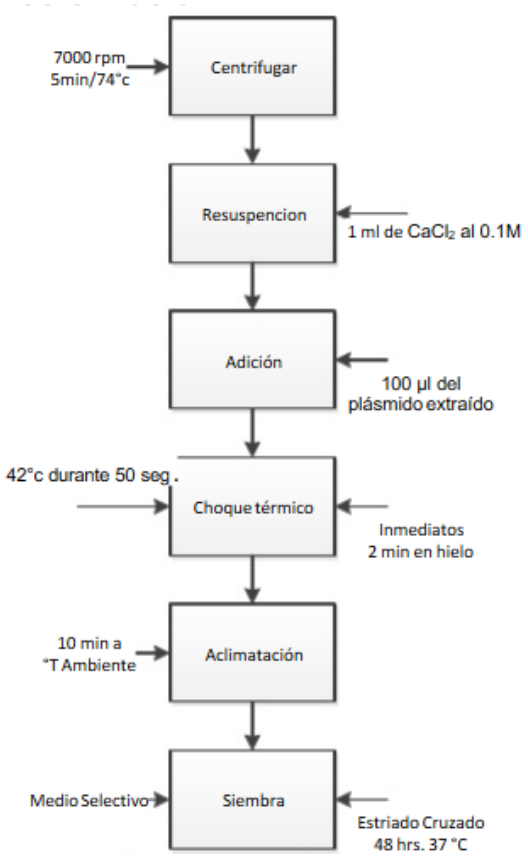


Figura 5. Protocolo de transformación bacteriana (Gee, 2016)

Tabla 1. Composición de caldo y medio solido LB (Luria-Bertani)

Triptona 1.0%
Extracto de levadura 0.5%
NaCl 1.0%
Agar 15 g/L para placas
pH 7.0

2.4.4. Prueba de solubilidad de la enzima Betalactamasa posterior a la inducción de expresión proteica.

Un buen punto de partida para la expresión de la enzima, es determinar la localización celular y solubilidad de la proteína de interés (Novagen, *op. Cit.,* 2006), en este caso la betalactamasa recombinante. Es deseable expresarla en su forma soluble, activa. La solubilidad de una proteína en particular es determinada por una variedad de factores, en este caso, se evaluó el tiempo y la concentración de inductor IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido**)** a la cual la enzima se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble. De esta manera, se puede incrementar la proporción de forma soluble para su posterior obtención y purificación.

2.4.5. Protocolo de inducción de bacterias *E. Coli BL21 (DE3)* con IPTG

Se induce la expresión del gen de betalactamasa del vector pET-21b(+) para su posterior extracción celular. La enzima se puede expresar del recombinante pET por inducción del promotor T7 mediante la adición de isopropil-1-tio-b-D-galactopiranósido (IPTG) en el medio de cultivo.

Inicialmente, se realizan cultivos pequeños de 5 mL de medio LB con ampicilina, y se adiciona una colonia transformada en tubo de ensayo. Lo anterior se deja en agitación constante (250 rpm) a 37°C entre 14 y 16 horas. A partir de este cultivo inicial se realiza una dilución de 100 veces, y se toma 500 µL del inicial y se agrega a 50 mL de medio LB + ampicilina. Se hace un cultivo control de la misma manera, pero a este no se le adiciona IPTG. Estos cultivos se agitan constantemente a 250 rpm en incubadora con agitación orbital Heidolph Inkubator, hasta tener una OD_{600} de 0.5 -1.0. Este valor de densidad óptica se monitorea en un espectrofotómetro con celdas de plástico, con la remoción de alícuotas asépticamente. Cuando se llega al OD_{600} deseado, se adiciona IPTG a uno de los medios y el otro se omite porque es el cultivo control.

Para hacer la prueba de solubilidad de la betalactamasa, se evaluaron tres concentraciones de IPTG: 1mM, 0.4mM, y 0.2mM en tres medios de cultivo de 50mL cada uno, preparados como la descripción anterior. Lo anterior se realizó a partir de una solución stock de 1M IPTG.

Tabla 2. Concentraciones de IPTG evaluadas

Concentración de IPTG (mM)	Volumen adicionado (µL)
1	50
0.4	20
0.2	10

Después de la adición de IPTG, se incuban los medios con sus respectivos controles, a 37°C con agitación constante (300 rpm) durante 19 horas.

2.4.6. Tratamiento de alícuotas de medios inducidos con IPTG.

Como se está evaluando una segunda variable que es el tiempo optimo donde se sobreexpresa la enzima en la fracción soluble, se procede a tomar 1mL de cada medio a tiempo 0 de inducción (justo antes de adicionar el IPTG), 6 horas, y 19 horas de inducción proteica. Estos tiempos permiten ver un amplio rango de diferencias en la producción de fracciones proteicas y así determinar cuál es el momento apropiado de sobreexpresión. Estas alícuotas se centrifugan a máxima velocidad por tres minutos, en una microcentrifuga Eppendorf 5424 ubicada en el laboratorio de investigación de Biología celular. El sobrenadante se aspira y los pellets resultantes se guardan en la nevera de -20 °C.

Para la obtención de las fracciones solubles e insolubles de cada muestra, se descongelan los pellets y cada uno se resuspende en 1mL de buffer lisis (40mM NaCl, Tris 25mM, 100mM KCl, 10% glicerol, 0.5% Triton X-100 y 10 mM imidazol). Posteriormente, las muestras se congelan en nitrógeno líquido y se calientan a 42 °C alternadamente, y esto se repite por 3 veces. Para facilitar la lisis celular, se adiciona lisozima 1mg/mL a cada muestra. Por último, se centrifugan las muestras a máxima velocidad en microcentrifuga por 1 minuto para precipitar las proteínas insolubles (Invitrogen , 2010); los sobrenadantes se transfieren a sus respectivos tubos eppendorf y se guardan en hielo.

2.4.7. Análisis de proteínas en fracción soluble / insoluble mediante electroforesis SDS PAGE.

Los pellets insolubles se resuspenden en 500 µL de buffer SDS-PAGE 1X (0.5M Tris-HCl, pH 6.8, Glicerol (100%), β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, SDS). Se toman 10 µL de cada muestra preparada y se calientan a 90°C para desnaturalizar las proteínas y así cargar las muestras en los posos del gel de poliacrilamida. Por otra parte, para el tratamiento de la fracción soluble, se deja descongelar los sobrenadantes obtenidos de cada alícuota de inducción, se toman 10 µL de cada

uno y se mezclan con 10 µL de buffer SDS-PAGE 2X. Se toman los 20 µL totales preparados de cada muestra y se dejan calentar a 90°C, luego de esto se cargan en los posos del gel junto con las muestras insolubles.

Para todas las electroforesis realizadas en este proyecto, se utilizó el marcador de peso molecular de Bio-Rad color azul entre un rango de pesos de 7.1 a 209 kDa. Se toma 5 µL de este reactivo luego de centrifugarlo brevemente. Se agrega 10 µL de buffer SDS-PAGE 2X y 5 µL de agua destilada. La anterior mezcla se adiciona al primer pozo del gel de poliacrilamida.

La técnica de electroforesis SDS PAGE posee un alto poder de resolución, debido a se deriva del uso de un sistema electroforético discontinuo, formado de dos geles de distinta porosidad y pH, que primero compactan las muestras (en el gel superior o compactador) y luego las separan (en el gel inferior o separador) como se muestra en la imagen (Lomonte, 2016). Para la realización de todas las electroforesis SDS – PAGE y el revelado de los geles de poliacrilamida del presente proyecto se llevó a cabo el protocolo con los respectivos reactivos descrito en la sección de anexos.

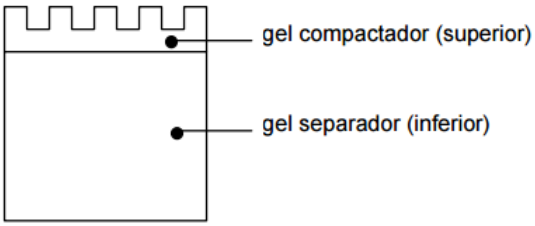


Figura 6. Partes de un gel de electroforesis SDS PAGE.

Se inicia la electroforesis durante 2 horas aproximadamente a 110 Volts. Posteriormente, se introduce el gel con las muestras en una solución de azul de coomassie por 3 minutos en microondas operando a máxima potencia. Luego, se hace el tratamiento con la solución para desteñir el gel durante 30 minutos y finalmente se elimina el exceso de colorante con lavado de agua y agitación para tener el adecuado contraste de las bandas con el fondo. Se tiene un gel decolorado para visualizar y tener un registro de las muestras adicionadas (Wong, Sridhara, & Bardwell, 2000).

2.4.8. Purificación enzimática por cromatografía de afinidad

2.4.8.1. Extracción de betalactamasa a partir de medios de cultivo de *E. Coli BL21(DE3)* inducidos.

Se preparó 100 mL de medio de cultivo de *E. Coli BL21(DE3)* inducido con 0.2 mM de IPTG, siguiendo el protocolo de inducción anteriormente descrito. Después de 19 horas se detiene su crecimiento y se centrifuga los 100 mL de cultivo divididos en dos tubos falcon, conteniendo 50 mL de cultivo cada tubo. Esto se realiza en

una centrifuga Eppendorf 5804 R, por 30 minutos, a 4°C y con velocidad máxima. Posteriormente, se pesa los dos pellets obtenidos, esto se registra como peso de células mojadas. En los dos tubos falcon se pesó 0.423 g. y 0.413 g. de pellet respectivamente, en total, 0.836 g. de células mojadas. Estos pellets se guardan a -80°C.

Para realizar el lisado celular de los pellets obtenidos, primero se descongelan por 15 minutos en hielo y luego se resuspenden en buffer de lisis (50mM NaH_2PO_4, 300mM NaCl, 10 mM imidazol). Se adiciona de 2-5 mL por cada gramo de células obtenida, así que en este caso se adicionó 5 mL de buffer lisis a los 0.836 g de pellet. Posteriormente, se agrega lisozima 1mg/mL y se incuba en hielo por 30 minutos. Luego, las células se someten a 12 ciclos de ultrasonido en el sonicador QSonica (con 125 W, 10 segundos por pulso y 10 segundos de descanso entre cada pulso). Lo anterior rompe las bacterias y libera la enzima del espacio periplasmático. Para degradar el ADN y ARN en el extracto celular, se adiciona 5 µL de Benzonasa comercial. Además, este reactivo disminuye la viscosidad del lisado obtenido. Por último, se centrifuga el lisado a velocidad máxima por 30 minutos a 4°C (Qiagen, 2003). El sobrenadante es la fracción de interés, ya que contiene la betalactamasa soluble.

Este mismo protocolo se replicó para la obtención de betalactamasa a partir de 500 mL de medio de cultivo de *E. Coli BL21(DE3)* inducido con 0.2 mM de IPTG. En este caso se pesó 5.0 g de pellet bacteriano, y se adicionó 10 mL de buffer de lisis.

2.4.8.2. Protocolo de purificación por cromatografía de afinidad con resina de Niquel para proteínas con cola de 6-His.

La purificación de la enzima betalactamasa se realizará mediante cromatografía de afinidad, utilizando una resina de Níquel comercial, específico para proteínas que posean una cola de histidinas. La adición de esta etiqueta de polihistidinas permite la afinidad obligatoria de la proteína, donde el vector pET-21b Pfluor-Betalac contiene la secuencia de ADN para producir la proteína de fusión. Mediante este método se produce la enzima betalactamasa con la secuencia adyacente de histidinas (6x His) hacia el codón 5´ del codón de iniciación.

Inicialmente, se agrega 1 mL de resina de Niquel-NTA y se mezcla con cada 4 mL del sobrenadante del lisado celular durante 1 hora en hielo, con agitación constante en shaker. Luego, se adiciona la mezcla a la columna de cromatografía de Sigma - Aldrich y se deja reposar por algunos minutos hasta que la resina quede compacta en la columna. Primero, se agrega 4 mL de buffer de lavado dos veces (50mM NaH2PO4, 300mM NaCl, 20 mM imidazol) a la columna y se recolectan las fracciones que salen del mismo. Finalmente, se adiciona 0.5 mL de buffer de elución (50mM NaH2PO4, 300mM NaCl, 250 mM imidazol) y esto se hace 4 veces, además se recolectan las fracciones que salen de la columna. En el buffer de elución se incrementa la concentración de imidazol para que se una a los iones de níquel y desplacen las proteínas (GE Healtcare, 2012).

Finalmente, para visualizar las proteínas presentes en cada paso de la purificación de betalactamasa, se siembran las distintas fracciones colectadas durante la inducción y purificación de la enzima en un gel de SDS-PAGE discontinuo al 5% de acrilamida (ver anexos). Durante cada paso experimental se tomó alícuotas de 1mL: a tiempo 0 y 19 de inducción, del lisado celular después de sonicar. También se tomó alícuotas de 10 µL de cada fracción de purificación. Se prepara el gel de corrida y se siembran las muestras con buffer SDS PAGE 2X en los respectivos posos.

2.4.8.3. Cuantificación de la betalactamasa recombinante purificada mediante el método de Bradford

Cuantificar la cantidad de proteína presente en las fracciones permite medir la purificación de una proteína y determinar el éxito de estrategia de la misma. En el caso de tener una enzima purificada, la cantidad de proteína y su masa permitirán hablar en términos moleculares, por ejemplo de la cantidad de producto por molécula de enzima, es decir, es necesaria su cuantificación para los posteriores estudios cinéticos de la betalactamasa. Las proteínas absorben radiación en el UV cercano (260-320 nm) debido a las cadenas laterales de los aminoácidos triptófano y tirosina. Como resultado, es una práctica común el usar la A_{280} nm para estimar la cantidad de proteína presente en una muestra. Para este efecto es necesario contar con una muestra bastante pura y conocer el coeficiente de absortividad de la enzima (ε), el cual depende de la composición de aminoácidos, pero este se ha calculado para la betalactamasa como primer paso de metodología (Universidad Icesi, 2016).

Se seguirá el protocolo del método comparativo de Bradford para la cuantificación de betalactamasa. En este, se usa la capacidad del tinte Coomassie Brilliant Blue G-250 de cambiar color una vez se une a una proteína. El tinte protonado tiene un máximo de absorción a max λ_{465} nm y es de color opaco. La interacción del tinte con la proteína lo desprotona y genera un intenso color azul (λ_{max} entre 595 y 620 nm) (Ibíd., 2016). Como patrón de referencia se usa la albumina de suero bovino (BSA).

Inicialmente, se prepara 10 mL de una solución madre de BSA a una concentración de 5 mg/mL en buffer fosfato 50 mM pH 7.0. Usando la solución madre se hacen soluciones de trabajo de 1 mL en agua de la concentración indicada en la tabla 3. Para cada solución patrón de BSA se mide la absorbancia en 280 nm en el espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis de Thermo Scientific, y mediante el coeficiente de absortividad molar del BSA se calcula la concentración experimental de cada patrón y así tener una curva de calibración más exacta y lineal.

Tabla 3. Preparación de soluciones patrón de BSA para la cuantificación de betalactamasa por el método de Bradford.

Concentración teórica BSA (mg/mL)	Volumen sln. Madre a emplear(µL)
0	0
0,2	40
0,4	80
0,6	120
0,8	160
1	200

Para cada una de las soluciones patrón, se toma 10 µL de las soluciones de BSA que se preparó antes y se adicionan 390 µL de agua y 600 µL de reactivo de Bradford, para completar 1mL de solución. Cada solución se incuba por 10 minutos en oscuridad y finalmente, se mide la A_{595} nm de las soluciones usando la que no tiene proteína BSA como blanco (Ibíd., 2016). Con lo anterior se construye la curva de calibración para la cuantificación de la betalactamasa purificada.

Como una estrategia, se pueden mezclar las fracciones de betalactamasa de interés y hacerles el mismo tratamiento de los patrones de BSA; tomar 10 µL de betalactamasa y adicionarle agua y reactivo de Bradford, finalmente medir su absorbancia a 595 nm. Con estos datos se puede calcular la concentración total de betalactamasa obtenida. Como se realizó dos purificaciones de betalactamasa, se construyó dos curvas de calibración para la cuantificación respectiva, como se registra en la sección de resultados.

2.8.9. Diálisis de betalactamasa purificada

La diálisis consiste en que una solución de varios tipos de moléculas es puesta en un bolso semipermeable de diálisis, como por ejemplo, en una membrana de celulosa con poros, y el bolso es sellado. El bolso de diálisis sellado se coloca en un vaso con una solución específica. Las moléculas lo suficientemente pequeñas como para pasar a través de los poros (a menudo agua, sales y otras moléculas pequeñas) tienden a moverse hacia adentro o hacia afuera del bolso de diálisis en la dirección de la concentración más baja. Moléculas más grandes (a menudo proteínas, ADN, o polisacáridos) que tiene dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro son retenidas dentro del bolso de diálisis (Lenardis, 2014). Una razón común de usar esta técnica puede ser para quitar la sal de una solución de la proteína.

Debido a que la betalactamasa purificada a partir de 100 mL tuvo muy poca concentración como se observa en la sección de resultados (1.232 µM), se utilizó la betalactamasa obtenida de los 500 mL para los ensayos de actividad enzimática. Sin embargo, las fracciones contienen 250mM de imidazol, y esta

concentración es muy grande a comparación del contenido enzimático, afectando así los ensayos de actividad enzimática. Por lo anterior, se realizó una diálisis, utilizando buffer tris 20 mM a pH 7.0, NaCl 50mM y una membrana proporcionada por el laboratorio de investigación de Fisicoquímica Farmacéutica de la Universidad Icesi. Se agregó 200 mL de este buffer y se dejó toda la noche para que ocurriera la diálisis; en la mañana se adicionó un nuevo volumen de 200 mL de buffer. Con este proceso la betalactamasa se concentrará debido a la perdida de imidazol.

2.8.10. Ensayo cualitativo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante con rojo de fenol

Se implementó y modificó el protocolo propuesto en el artículo científico “Rapid Detección of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae” para la identificación colorimétrica de actividad enzimática de la betalactamasa purificada y dializada. Este es un ensayo rápido y sencillo, basado en la identificación de hidrolisis del anillo betalactámico de los antibióticos por parte de la betalactamasa (Nordmann & Poirel, 2012); en este caso, se utiliza como sustrato ampicilina. Lo anterior se evalúa con rojo de fenol, un indicador de pH muy utilizado en medios de cultivos, el cual vira a amarillo a pH inferiores de 6.8; vira a rojo a pH por encima de 8.2, y entre pH 6.8 y 8.2 otorga tonalidades naranjas en la solución (Goméz, 2010).

El ensayo consta de la preparación de una solución de ensayo enzimático que es 1mM de $ZnSO_4$ (el cofactor de la betalactamasa), 8.077 mM de ampicilina, y 8.465 mM de rojo de fenol a pH 7.8. Para esto, se hicieron soluciones stock de cada reactivo: 1mL de solución stock de ampicilina 10 mg/mL; 1mL de solución stock de $ZnSO_4$ 0.1M; y 20 mL de solución stock de rojo de fenol 0.141M, pH 7.8. A partir de estas soluciones stock se realizó 1mL de solución de ensayo de actividad enzimática como se registra en la tabla 4.

Tabla 4. Preparación de 1mL de solución de ensayo de actividad enzimática de betalactamasa recombinante

Reactivo	Concentración en sln. (mM)	Volumen adicionado (µL)
Ampicilina	8.077	300
Sulfato de Zinc	0.1	1
Rojo de fenol	8.465	60
Agua		639
Total volumen		1000

Con esta solución de ensayo se evaluó la actividad enzimática de la betalactamasa dializada, y la presencia de actividad en el lisado celular luego de romper las bacterias en el sonicador. El test se llevó a cabo en una microplaca de 96 pozos; en cada pozo se adicionó 20 µL de extracto enzimático y 100 µL de solución de ensayo, luego se incuba a 37°C por algunos minutos para que la reacción de hidrolisis de la ampicilina se lleve a cabo y luego se observa el color de cada solución.

2.8.11. Ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante para el cálculo de parámetros cinéticos.

Se planteó un ensayo de actividad enzimática midiendo la absorbancia de una solución de ensayo junto con betalactamasa dializada, como se describió anteriormente, a través del tiempo. El rojo de fenol tiene una absorbancia máxima a 423 nm en su forma protonada, de esta manera, se puede calcular la concentración de sustrato ampicilina que se hidroliza debido a que, la concentración de rojo de fenol protonado es equivalente a la concentración de ampicilina hidrolizada. Lo anterior se requiere con el fin de construir una curva de concentración de sustrato vs velocidad inicial de reacción. La velocidad de reacción se calcula mediante las pendientes de las rectas de absorbancia vs tiempo. A partir de las gráficas se calcula la constante cinética de velocidad máxima (V_{max}) y la constante de afinidad enzimática (K_m), describiendo el comportamiento catalítico de la enzima en cuestión.

Se preparó una solución rojo de fenol pH 6 para la realización del ensayo, a partir de buffer Tris 5mM + 3000µL Stock rojo de fenol pH 7,8. En la tabla 5, se registra el tiempo de reacción medido para cada solución con betalactamasa, los intervalos de medición y el volumen de solución de ensayo en cada cubeta del espectrofotómetro. En la tabla 6, se registra cada concentración de sustrato utilizado en cada test, y la enzima adicionada para la reacción catalítica.

Tabla 5. Parámetros de ensayo enzimático con rojo de fenol en espectrofotómetro

Cantidad total por cubeta	200uL
Concentración enzima	37,5uM
Abs medición	423nm
Tiempo de medición total	15 minutos
Intervalos de medición	30 segundos

Tabla 6. Soluciones de ensayo de actividad enzimática con rojo de fenol a diferentes concentraciones de ampicilina

Numero	Concentración sustrato	Volumen ad. Agua	Volumen ad. Amp	Volumen ad. Sln Ensayo	Cantidad enzima
1	8mM	34uL	60uL	100uL	6uL
2	4mM	64uL	30uL	100uL	6uL
3	2mM	79uL	15uL	100uL	6uL
4	1mM	86,5uL	7,5uL	100uL	6uL
5	500µM	90,2uL	3,75uL	100uL	6uL
6	250µM	92,13uL	1,87uL	100uL	6uL
7	125µM	93,06uL	0,93uL	100uL	6uL
8	62,5µM	93,4uL	0,46uL	100uL	6uL
9	31,5µM	93,76uL	0,23uL	100uL	6uL

Se planteó un ensayo similar de actividad enzimática, con la diferencia de no agregar rojo de fenol a la solución de ensayo, sino medir directamente el cambio de concentración de ampicilina en el espectrofotómetro. Se realizó un barrido en el rango UV en una solución de ampicilina 10 mg/mL para determinar el pico de absorbancia máximo a una longitud de onda determinada. Con este valor se realizó las mediciones de absorbancia a cada solución de ensayo enzimático, registradas en la tabla 7.

Tabla 7. Soluciones de ensayo de actividad enzimática a diferentes concentraciones de ampicilina.

Numero	Concentración sustrato	Volumen de Tampón fosfato (µL)	Volumen ad. Amp (µL)	Cantidad enzima
1	8mM	142	60	6uL
2	4mM	164	30	6uL
3	1mM	186	7,5	6uL
4	500µM	190,2	3,75	6uL
5	250µM	190,3	1,87	6uL
6	62,5µM	193,4	0,46	6uL
7	31,5µM	193,8	0,23	6uL

Finalmente, en la tabla 8 se presenta la metodología propuesta en proyecto de grado I para la realización de este trabajo.

Tabla 8.Matriz de marco lógico planteado en proyecto de grado I.

OBJETIVO GENERAL			
Realizar la caracterización cinética de la betalactamasa de *Pseudomona fluorescens,* producida de forma recombinante en bacterias *E. Coli BL21(DE3),* empleando como sustrato ampicilina, para finales del año 2016 en la universidad Icesi.			
	ACTIVIDADES	**SUPUESTOS**	**INDICADOR**
OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Emplear herramientas bioinformáticas, para analizar la secuencia de nucleótidos de la enzima betalactamasa de *P. fluorescens*.	-Obtener la estructura primaria de la enzima a partir de la secuencia de nucleótidos del gen de betalactamasa mediante la base de datos GeneBank. -Determinar los principales parámetros bioquímicos (peso molecular y punto isoeléctrico) mediante la herramienta ProtParam del ExPASy.		Determinar los principales parámetros bioquímicos de la enzima betalactamasa como su punto isoeléctrico y peso molecular.
OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Transformar bacteria *E. Coli BL21 (DE3),* con un plásmido comercial pET-21b que contiene el gen de interés.	-Estudiar protocolos de competencia y transformación bacteriana en la literatura. -Comprar plásmido comercial pET con el gen de betalactamasa de *P. fluorescens*. -Ejecutar protocolos de competencia y transformación bacteriana en bacterias *E. Coli BL21.* -Confirmar	-Lograr establecer el protocolo que permita la transformación de *E. Coli BL21* eficientemente. -El plásmido debe llegar bajo condiciones específicas y en un tiempo establecido.	Obtener bacterias transformadas que logren expresar la betalactamasa recombinante.

	transformación bacteriana en medio con ampicilina, comparando con controles. -Amplificar bacterias transformadas		
OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Extraer y purificar la betalactamasa producida en *E. Coli BL21 (DE3),* por la técnica de cromatografía de afinidad mediante una resina de Níquel comercial.	- Estudiar protocolos de purificación por cromatografía de afinidad mediante metales inmovilizados, en la literatura. -Comprar resina de Ni para la purificación de proteínas en cromatografía de afinidad -Ejecutar el protocolo de purificación de proteínas -Realizar el seguimiento de la purificación de betalactamasa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) -Obtención de fracciones purificadas de la betalactamasa recombinante.	-Presencia de betalactamasa en el lisado celular de extracción. -Lograr establecer el protocolo que permita la purificación de la enzima eficientemente.	Obtener una fracción de betalactamasa purificada con concentración determinada.
OBJETIVO ESPECÍFICO 4: Medir los parámetros cinéticos de reacción enzimática de la betalactamasa recombinante aislada, como la constante de	-Estudiar protocolos de ensayos espectrofotométricos de cinética enzimática, en la literatura. -Realizar un ensayo enzimático de la betalactamasa	-Contar con la disponibilidad de los reactivos para llevar a cabo el protocolo -Disponer de un espectrofotómetro en buen estado y	Verificar la actividad catalítica de la betalactamasa purificada mediante estudios espectrofotométricos de cinética

Michaelis (K_m) y la velocidad máxima de catálisis (V_{max}) frente al sustrato ampicilina.	purificada utilizando ampicilina como sustrato, durante un tiempo de reacción especifico. -Monitorear cambios de absorbancia en la mezcla durante todo el tiempo de reacción enzimática. -Calcular mediante un software, los parámetros cinéticos de reacción K_M y V_{max} -Obtener una gráfica de Michaelis y Menten correspondiente a la actividad catalítica de la betalactamasa purificada, ubicando la K_M y V_{max} en dicha gráfica.	calibrado.	enzimática.

2.5. Resultados

2.5.1. Análisis Bioinformático de la enzima Betalactamasa

Mediante la herramienta computacional online ProtParam del ExPASy (http://web.expasy.org/protparam/) se calculó los parámetros bioquímicos teóricos para la enzima betalactamasa expresada por el plásmido comercial pET-21b Pfluor-Betalac, de acuerdo a la secuencia de aminoácidos de la proteína usada en el input del software.

Tabla 9.Parámetros bioquímicos calculados en ProtParam del ExPASy

Parámetro Bioquímico	Valor con unidades
Punto Isoeléctrico	6.73
Peso molecular	39.7KDa
Coeficiente de extinción molar	$44810 M^{-1} cm^{-1}$

2.5.2. Transformación de la cepa *E. Coli BL21 (DE3)*

Se obtuvo células transformadas *E. Coli BL21 (DE3)* al insertarles el vector comercial pET-21b Pfluor-Betalac, como se registra en la figura 7. Se realizó tres replicas en las cajas de Petri correspondientes y en cada uno se obtuvo colonias aisladas. Por otra parte se ejecutó los respectivos controles positivo y negativo (figura 8) para evaluar o probar algún error en el proceso de transformación. En el control positivo se observa un crecimiento excesivo de células por la ausencia de ampicilina en el medio, probando que las células son viables para el crecimiento, sin embargo, en el control negativo no hay crecimiento, estando la placa intacta a pesar que se ha inoculado previamente. En el control negativo se esperaba efectivamente un crecimiento nulo debido a que las bacterias inoculadas son competentes, pero no contienen el plásmido pET-21b Pfluor-Betalac, así que no pueden sobrevivir al medio LB agar con ampicilina porque no expresan la betalactamasa recombinante. Con este control se confirmó que la ampicilina tiene una acción bactericida y que se encuentra en buen estado para las posteriores pruebas a realizar.

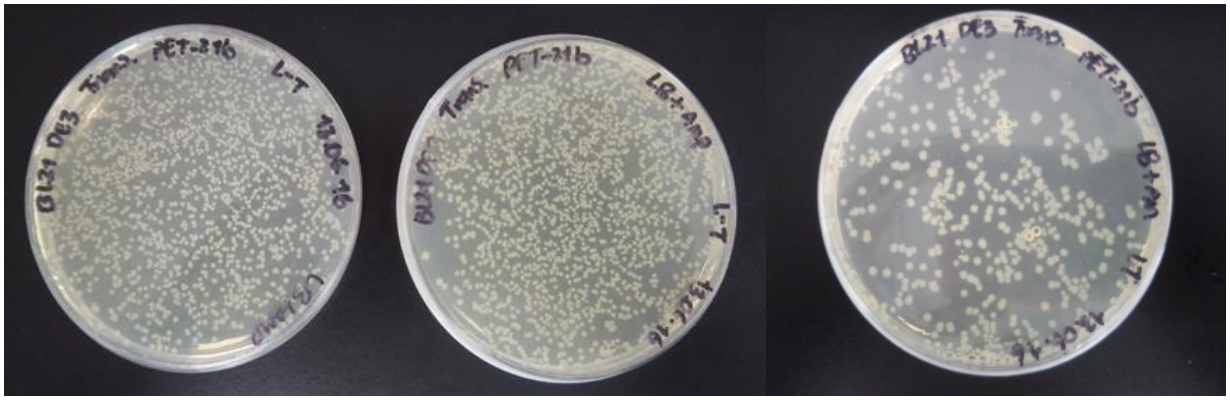


Figura 7. Placas de LB agar + ampicilina con bacterias *E. Coli BL21 (DE3)* transformadas.

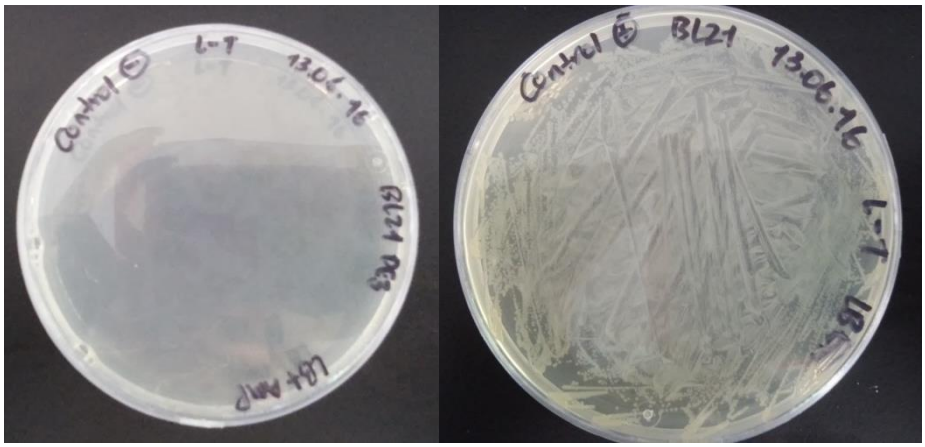


Figura 8. Control positivo (derecho) y negativo (Izquierdo) de transformación bacteriana *E. Coli BL21 (DE3).*

2.5.3. Prueba de solubilidad de la enzima Betalactamasa posterior a la inducción de expresión proteica.

Se evaluó la concentración de IPTG y el tiempo de inducción óptimo de sobreexpresión de betalactamasa recombinante, donde la fracción de enzima producida fuera en su mayoría soluble. A continuación se muestra los resultados del análisis electroforético al adicionar 1mM (figura 9), 0.4mM (figura 10) y 0.2 mM (figura 11) de IPTG a los medios de cultivo respectivos. Cada análisis se hizo durante 19 horas, y se evalúa también el tiempo donde se encuentre la mayor parte de la enzima en la fracción soluble.

En todas las pruebas realizadas, se observa la banda azul intensa correspondiente a la enzima betalactamasa, de acuerdo al cálculo de su peso molecular realizado en ExPASy (39.7 KDa). Esta banda es la única que se encuentra ubicada entre las bandas del marcador de peso molecular 49.1 y 34.8 KDa. Por lo anterior, se puede afirmar que corresponde a la betalactamasa recombinante expresada, no solo por su intensidad única en el gel, sino también porque corresponde con el peso calculado de la misma y así confirmamos su identidad. Por otra parte, la banda inferior intensa en todas las imágenes corresponde a lisozima (14.4 KDa), debido a que esta enzima fue utilizada en el tratamiento de las muestras, como se describe en la sección de metodología.

De acuerdo a la figura, se muestra que al adicionar 1mM de IPTG, la producción de enzima insoluble es siempre mayor en las bacterias *E. Coli BL21 (DE3)* a través del tiempo evaluado, según las bandas reveladas en el gel de poliacrilamida. A las 6 y 19 horas, las bandas color azul son siempre más amplias e intensas en las fracciones insolubles proteica, a comparación de las bandas correspondientes a las fracciones solubles. Cuando se observa la figura, propio a una concentración de 0.4 mM de IPTG, se tiene el mismo patrón de la prueba anterior, una fracción mayor de enzima insoluble ya que estas bandas son más intensas en el gel.

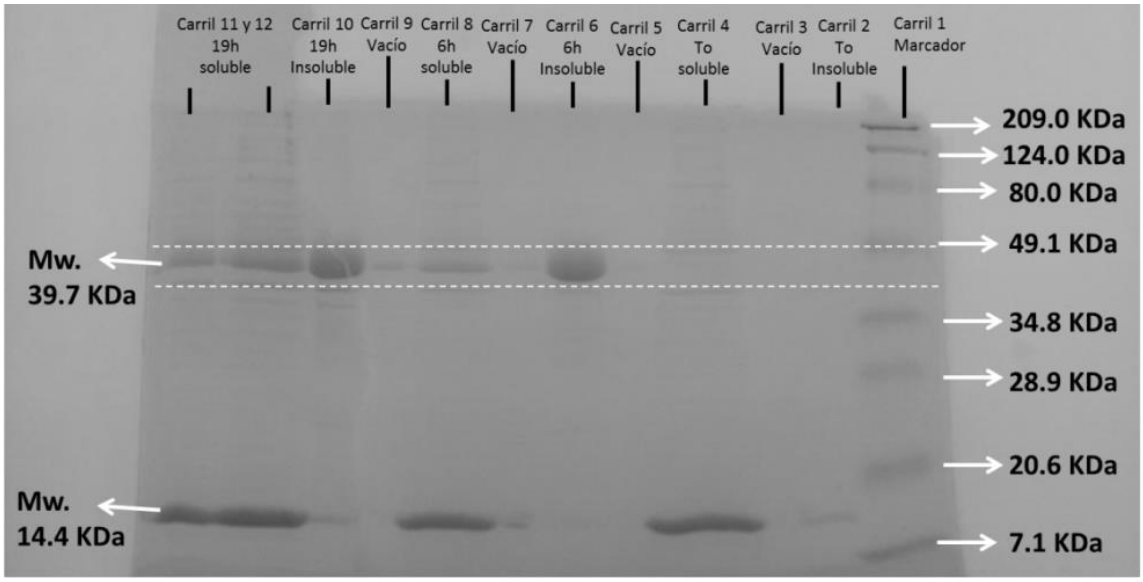


Figura 9. Prueba de solubilidad de betalactamasa recombinante (entre líneas punteadas) en un cultivo de *E. Coli BL21 (DE3)* inducido con 1mM de IPTG en tiempo 0, 6 y 19 horas (de derecha a izquierda).

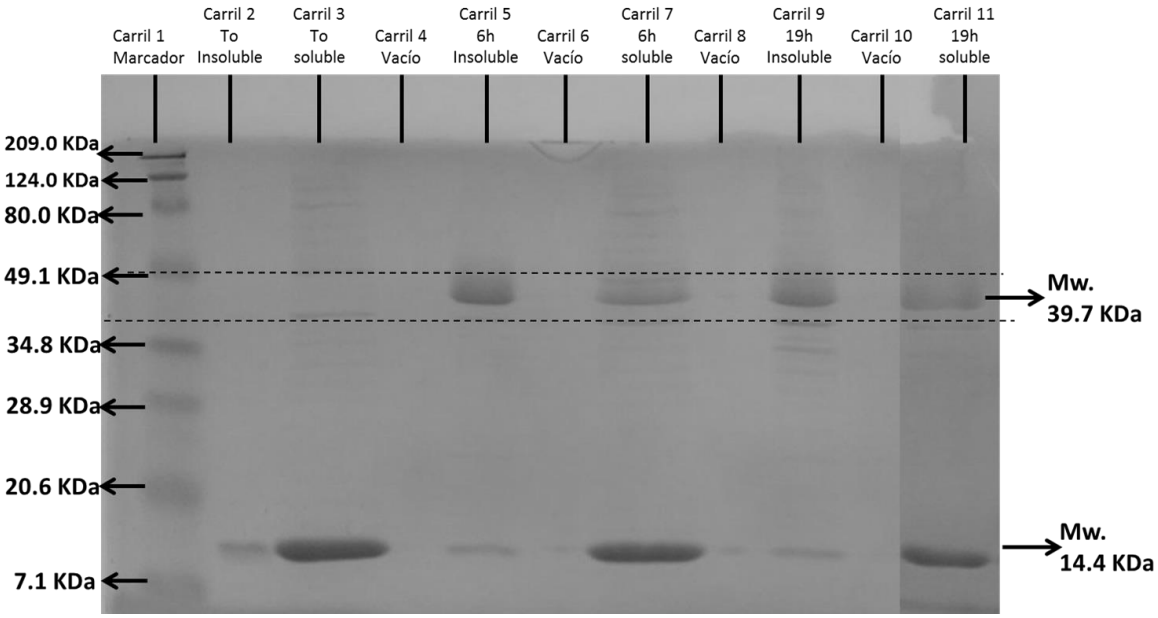


Figura 10. Prueba de solubilidad de betalactamasa recombinante (entre líneas punteadas) en un cultivo de *E. Coli BL21 (DE3)* inducido con 0.4 mM de IPTG en tiempo 0, 6 y 19 horas (de izquierda a derecha).

Sin embargo, el análisis del gel que corresponde a una concentración de 0.2 mM de IPTG muestra que a las 19 horas de inducción la betalactamasa se encuentra significativamente en la fracción soluble, a pesar que en la fracción insoluble haya una parte aun, la banda es un poco más intensa en el poso 19 h soluble. Se puede concluir de estos resultados que a las 19 horas de inducción con una

concentración de IPTG de 0.2mM en el medio de cultivo, se puede obtener la enzima betalactamasa sobreexpresada en la forma soluble mayoritariamente.

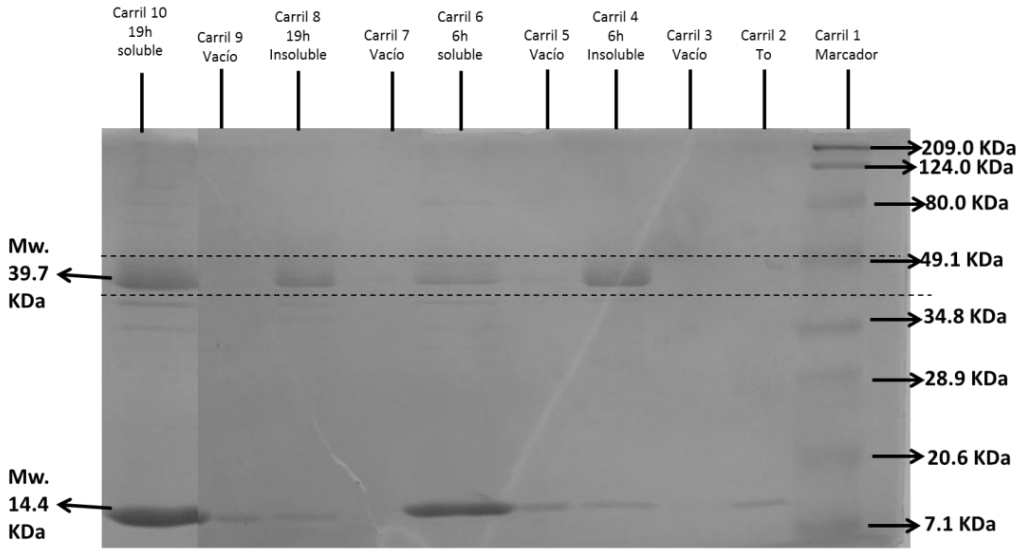


Figura 11. Prueba de solubilidad de betalactamasa recombinante (entre líneas punteadas) en un cultivo de *E. Coli BL21 (DE3)* inducido con 0.2 mM de IPTG en tiempo 0, 6 y 19 horas (de derecha a izquierda).

2.5.4. Purificación de la enzima betalactamasa mediante cromatografía de afinidad

Mediante una recolección de alícuotas en cada paso de inducción y purificación de la betalactamasa a partir de un medio de cultivo de 100 mL de *E. Coli BL21 (DE3)*, se obtuvo un gel de poliacrilamida revelado (figura 12), indicando la sobreexpresión de la betalactamasa recombinante (39.7 KDa) y su grado de pureza en cada fracción de elución, donde se observa que la fracción 3 y 4 de elución son las que tienen menos contenido proteico indeseado u otras impurezas, ya que en estos pozos es donde sólo se observa la banda de la betalactamasa, además en la elución tres es donde se puede ver mayor intensidad, probablemente porque es la fracción que tiene mayor contenido de betalactamasa.

Por otra parte, se realizó la purificación de betalactamasa a partir de un cultivo de 500 mL de *E. Coli BL21 (DE3)* inducido (figura 13). La foto de este gel se editó en blanco y negro para una mejor visualización y contraste, debido a que el revelado no tuvo tan buena calidad como el anterior gel. En este caso se observa la sobreexpresión de la betalactamasa pero no con el grado de pureza que se busca, sin embargo, se repite que en la elución 3 se encuentre posiblemente la mayor cantidad de enzima junto con la elución 4. Posteriormente se analizaran las causas de las posibles impurezas en la segunda réplica del experimento.

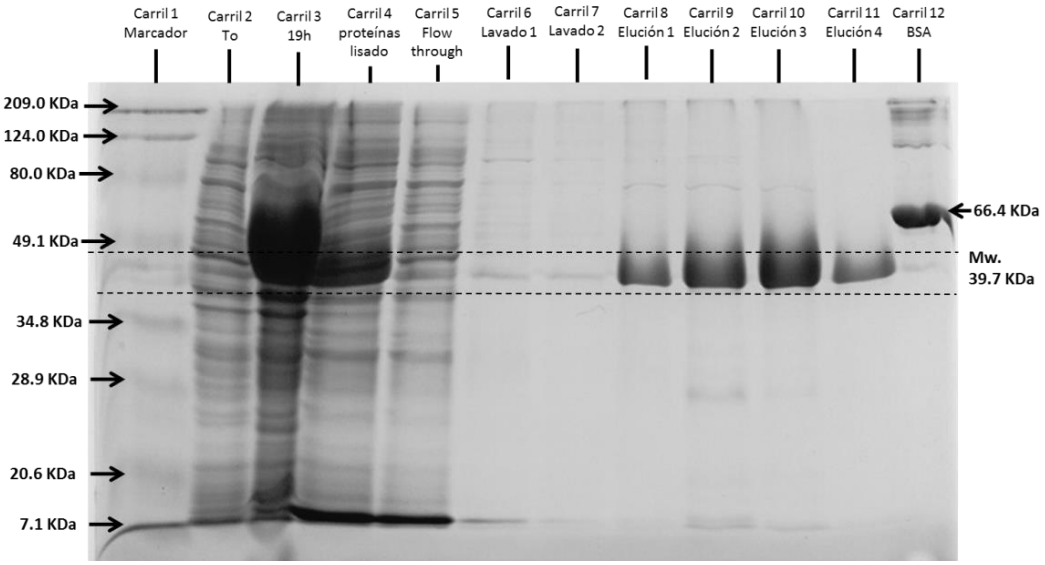


Figura 12. Gel de electroforesis SDS PAGE para el seguimiento de inducción y purificación de la enzima betalactamasa recombinante, ubicada entre líneas punteadas (ver de izquierda a derecha), a partir de un cultivo de 100 mL de *E. Coli BL21 (DE3).*

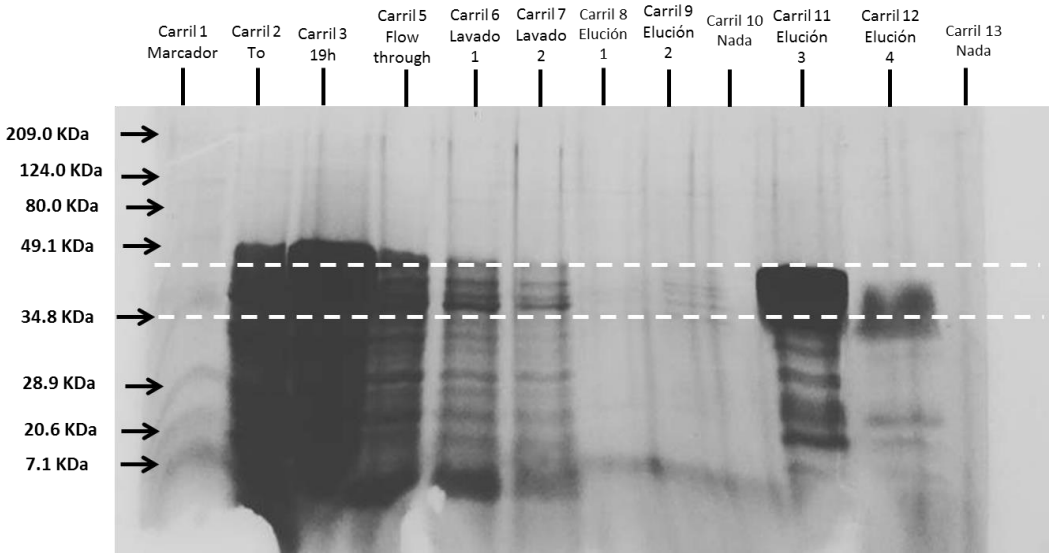


Figura 13. Gel de electroforesis SDS PAGE para el seguimiento de inducción y purificación de la enzima betalactamasa recombinante, ubicada entre líneas punteadas (ver de izquierda a derecha). A partir de un cultivo de 500 mL de *E. Coli BL21 (DE3).*

2.5.5. Cuantificación de la betalactamasa recombinante purificada mediante el método de Bradford

Se construyó una curva de calibración con soluciones patrón de BSA (albumina de suero bovino), y a partir de ella se logró calcular la concentración de betalactamasa en las fracciones de purificación. Se unieron las cuatro eluciones de la primera purificación realizada, debido a que todas las fracciones tenían una pureza aceptable. En total, a partir de la primera purificación realizada, se cuantificó 2 mL de elución proteica.

Inicialmente, se construyó la curva de calibración. Mediante la absorbancia de las soluciones patrón a 280 nm y el coeficiente de absortividad molar del BSA ($47790 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$) se calculó la concentración experimental de las soluciones patrón para tener una exactitud y linealidad mayor en la construcción de la curva de calibración. Se empleó el siguiente tratamiento matemático con la ley de Lambert-Beer

$$A = \varepsilon bc$$

Se tiene el valor de b= 1cm, ε= $47790 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$ y los valores de absorbancia de cada solución patrón registrados en la tabla 10. Tomamos la solución patrón de BSA 0.2 mg/mL para ejemplificar el cálculo de concentración, el cual están registrados en la tabla. Se reemplazan los valores de b, ε y A en la ley de Lambert – Beer y se despeja la concentración de la solución patrón.

$$0.116 = 47790 M^{-1} cm^{-1}\ x\ 1cm\ x\ C$$

$$C = \frac{0.116}{1\ cm\ x\ 47790 M^{-1} cm^{-1}} = 2.427 x 10^{-6} M$$

Como estamos expresando las concentraciones en mg/mL, se convierte la molaridad obtenida mediante la masa molecular del BSA que es 69293,4 g/mol de la siguiente manera

$$2.427 x 10^{-6} \frac{mol}{L} BSA\ x\ \frac{69293.4\ g}{mol\ BSA}\ x\ \frac{1L}{1000mL}\ x\ \frac{1000\ mg}{1g} = 0.168 \frac{mg}{mL} BSA$$

Todas las concentraciones de las soluciones patrón de BSA se registran en la tabla 10. Posteriormente, se calcula la cantidad de proteína usada en cada solución patrón para la cuantificación por 595 nm, expresada en microgramos (µg) de la siguiente manera, donde el factor de dilución utilizado es 1/100.

$$Cantidad\ de\ proteína\ usada\ (\mu g) = Concentracion\ calculada\ BSA\ x\ Factor\ de\ dilución$$

Los valores de cantidad de proteína usada y la absorbancia de cada patrón con el reactivo de Bradford a 595 nm se registran en la tabla 11. Con estos valores se

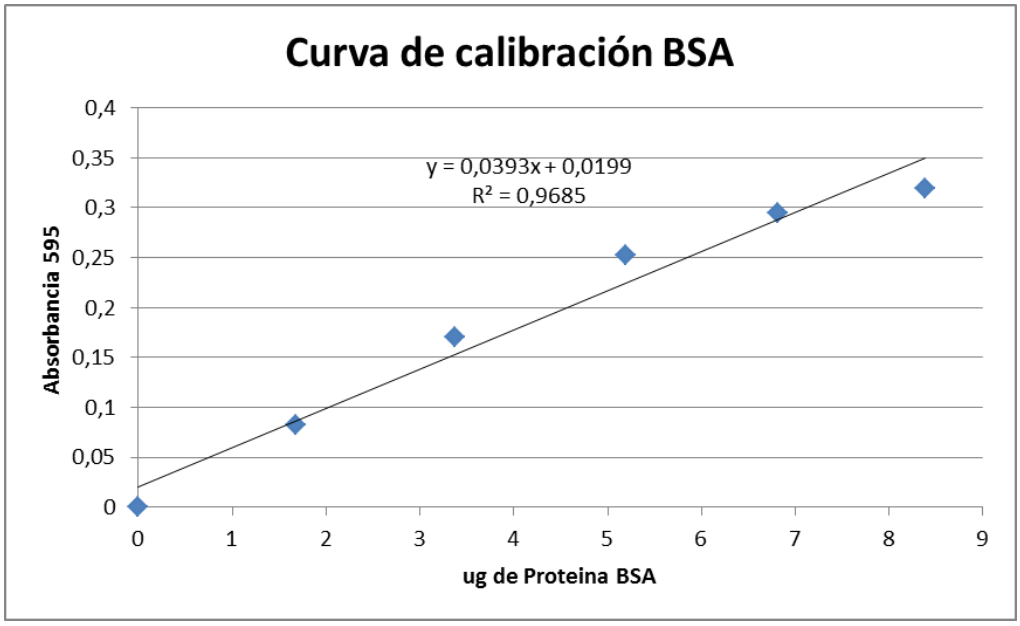
puede construir la curva de calibración como se observa en la gráfica 1 y así determinar la cantidad de betalactamasa purificada. La muestra problema, que es la elución de betalactamasa registró un valor de A_{595} = 0.145, ubicada en la parte inferior de la tabla 11.

Tabla 10.Concentración experimental calculada de patrones de BSA mediante la medida de A280.

Concentración teórica BSA (mg/mL)	Volumen sln. Madre a emplear(µL)	A280	Concentración calculada BSA (mg/mL)
0	0	0	0
0,2	40	0,116	0,168
0,4	80	0,233	0,337
0,6	120	0,358	0,519
0,8	160	0,47	0,681
1	200	0,579	0,839

Tabla 11. Valores calculados y medida de A595 para la cuantificación de betalactamasa por el método de Bradford.

Concentración teórica BSA (mg/mL)	Concentración calculada BSA (mg/mL)	Cantidad de proteína usada (ug)	A595
0	0	0	0
0,2	0,168	1,68	0,082
0,4	0,337	3,37	0,17
0,6	0,519	5,19	0,252
0,8	0,681	6,81	0,295
1	0,839	8,39	0,319
Muestra Betalactamasa			0,145



Grafica 1. Curva de calibración para la cuantificación de betalactamasa por el método de Bradford con patrones de BSA.

Para el cálculo de concentración de enzima, se utiliza de nuevo la ley de Lambert – Beer y la ecuación de la recta de calibración. El tratamiento matemático es el siguiente: se extrapola la ecuación de la recta obtenida con la ley de Beer, tomando el valor de absorbancia a 595 de la muestra de betalactamasa (0.455)

$$y = 0.0393x + 0.0199$$

$$A_{595} = 0.0393/\mu g\ proteína\ x\ C + 0.0199$$

$$0.455 = 0.0393/\mu g\ proteína\ x\ C + 0.0199$$

$$C = \frac{0.455-0.0199}{0.0393}\ \mu g\ proteína = 3.18\ \mu g\ \text{betalactamasa}$$

Con el factor de dilución se puede calcular la concentración en g/L, debido que para la toma de absorbancia a 595 nm se tomó 65 µL de elución. Además, se expresa la concentración en molaridad debido al valor de peso molecular de la betalactamasa obtenido en ExPASy.

$$C = 3.18\ \mu g\ x\ \frac{1}{65\ \mu L} = 0.0489\ \frac{\mu g}{\mu L}\ betalactamasa$$

$$C = 0.0489\frac{g}{L}\ x\ \frac{1\ mol\ betalac.}{39682.13\ g} = 1.232\ x\ 10^{-6}M = 1.232\mu M\ betalactamasa$$

También se puede cuantificar la cantidad total de enzima presente en los 2 mL de elución. A partir de 100 mL de medio de cultivo se obtiene 97.8 µg de betalactamasa recombinante purificada. En la tabla 12 se registra un resumen de los datos de cuantificación calculados.

$$0.0489\,\frac{\mu g}{\mu L}\ betalactamasa\ x\ 2000\mu L\ elución = 97.8\ \mu g\ betalactamasa$$

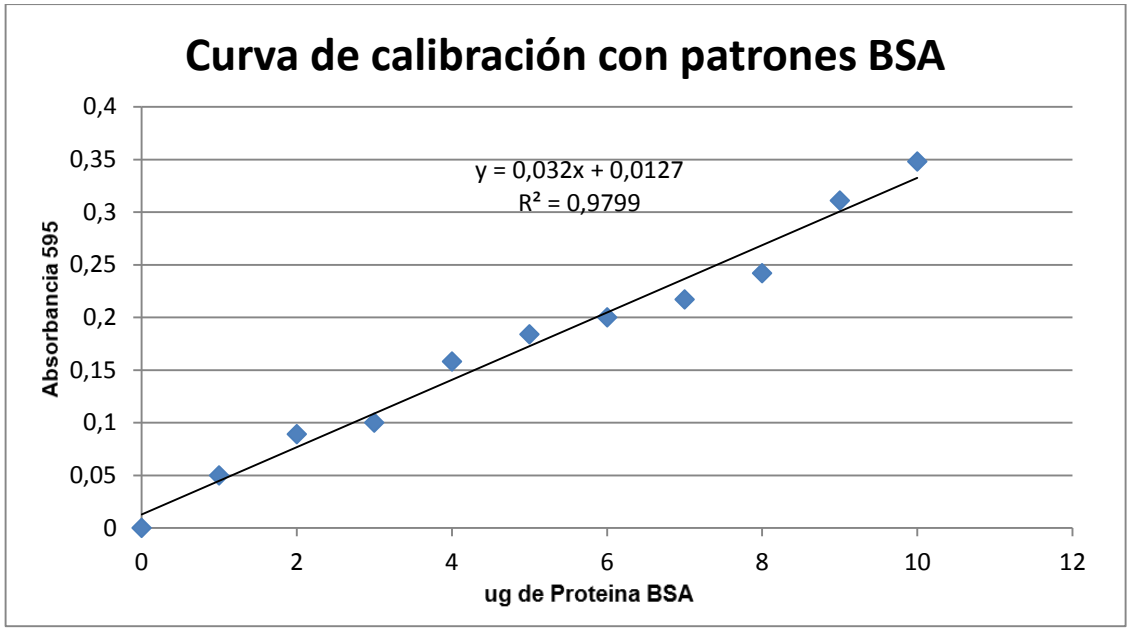
Tabla 12. Valores de cuantificación de betalactamasa a partir de 2 mL de elución y 100 mL de cultivo *E. Coli BL21 (DE3).*

Concentración (g/L)	0.0489
Concentración (µM)	1.232
Cantidad de proteína total (µg)	97.8

Para la cuantificación del segundo proceso de purificación de betalactamasa a partir de 500 mL de cultivo bacteriano, se procedió de la misma manera, sin embargo se debe realizar una nueva curva de calibración con patrones de BSA. En la tabla 13 se registran los valores de cantidad de proteína usada de BSA y sus respectivas absorbancias a 595 nm, además de la absorbancia de la elución de betalactamasa. Con estos valores se construyó la curva de calibración de la gráfica 2.

Tabla 13. Valores de absorbancia a 595 nm de soluciones patrón de BSA y betalactamasa

Cantidad de BSA (µg)	**A595**
0	0
1	0,05
2	0,089
3	0,1
4	0,158
5	0,184
6	0,2
7	0,217
8	0,242
9	0,311
10	0,348
Betalactamasa	0,1



Grafica 2. Curva de calibración para la cuantificación de betalactamasa por el método de Bradford con patrones de BSA.

Para hacer los cálculos de concentración y contenido total de betalactamasa se realizó el tratamiento matemático. Según la figura 13, se mezcló la elución 3 y 4, de 0.5 mL cada una, debido a que eran las fracciones que poseían mayor contenido enzimático a pesar de su baja pureza. En total, se cuantifico una muestra de 1 mL de elución de betalactamasa, y se tomó 2 µL de la misma para la medición de absorbancia en el espectrofotómetro. De acuerdo a estos volúmenes y la ecuación de la recta de calibración se calculó la concentración de betalactamasa obtenida y su contenido proteico total a partir de 500 mL de cultivo como se registra en la tabla 14. Al comparar las tablas 12 y 14, se concluye que aumentar el volumen de cultivo bacteriano, permite la obtención de mayor cantidad de enzima betalactamasa.

Tabla 14. Valores de cuantificación de betalactamasa a partir de 1 mL de elución y 500 mL de cultivo *E. Coli BL21 (DE3).*

Concentración (g/L)	1.50
Concentración (µM)	37.80
Cantidad de proteína total (µg)	1500

2.5.6. Diálisis de la betalactamasa

Con la diálisis realizada, se hizo una dilución de 200 veces para la disminución de concentración de imidazol. Se llegó a una concentración final de 1.25 mM de imidazol.

2.5.7. Ensayo cualitativo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante con rojo de fenol.

De acuerdo al ensayo enzimático realizado, se tuvo un resultado colorimétrico que se observa en la figura 14. Se hizo un ensayo control con hidróxido de sodio para ver la tonalidad roja en medio básico. Se observa el cambio de color cuando se evalúa la actividad de la betalactamasa en el lisado celular y cuando se ha purificado y dializado. En ambos casos hay un viraje amarillo porque el medio se torna ácido debido a la hidrolisis de la ampicilina, sin embargo, en el lisado se puede evidenciar una tonalidad más anaranjada indicando una actividad reducida de la betalactamasa presente. Lo anterior se debe a que en el lisado celular se encuentran todas las proteínas de *E. Coli*, por lo que posiblemente hay proteasas que degraden enzimas como la betalactamasa. No obstante, en el tercer pozo se observa actividad catalítica de hidrolisis, confirmando así la actividad enzimática deseada de la betalactamasa recombinante.

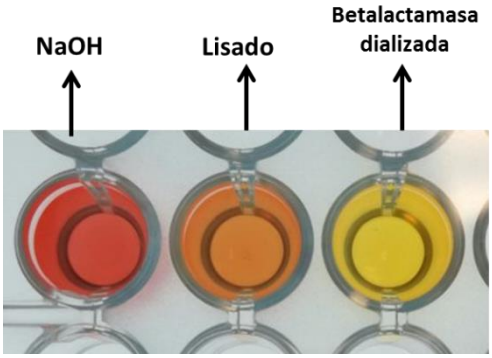
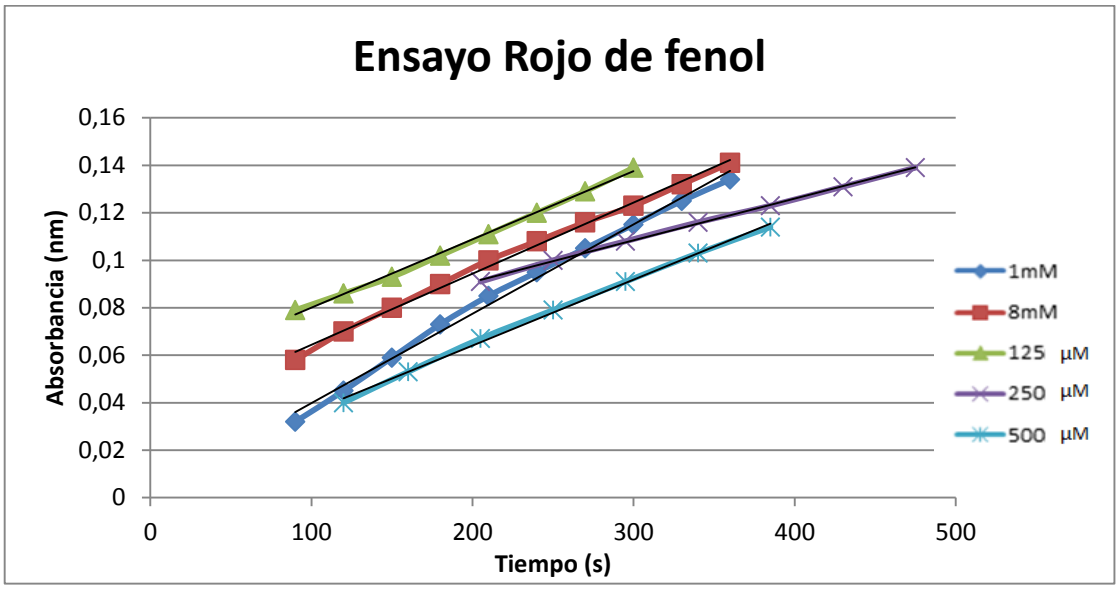


Figura 14. Ensayo cualitativo de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante con rojo de fenol. De izquierda a derecha (solución de ensayo con NaOH, solución de ensayo con lisado celular, solución de ensayo con betalactamasa purificada y dializada).

2.5.8. Ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática de la betalactamasa recombinante para el cálculo de parámetros cinéticos.

Mediante las absorbancias en el espectrofotómetro de las reacciones enzimáticas a través del tiempo, con rojo de fenol, se obtuvo el comportamiento descrito en la gráfica 3. Esto indica que a través del tiempo la concentración de rojo de fenol protonado aumentó de acuerdo a la hidrolisis de ampicilina. En la tabla 15 se extrapoló el comportamiento de reacción en los primeros 90 segundos del ensayo enzimático para verificar el comportamiento de las pendientes necesarias para el cálculo de velocidades iniciales de reacción.



Grafica 3. Ensayo de actividad enzimática con rojo de fenol a diferentes concentraciones de ampicilina a 423 nm.

Tabla 15. Pendientes de las curvas en los primeros 90 segundos de reacción en el ensayo enzimático con rojo de fenol.

Concentración sustrato	Pendiente de la curva de ensayo enzimático
125µM	0,0013
250µM	0,0016
500µM	0,0004
1 mM	0,0005
8 mM	0,0004

Por otra parte, para el segundo ensayo enzimático propuesto midiendo la absorbancia de la ampicilina directamente, se realizó un barrido en el espectro UV. De acuerdo a esto, se logró concluir que la longitud de onda a la cual la ampicilina tiene un máximo de absorción es 230 nm. Este valor se utilizó para todas las mediciones de absorbancia de las soluciones de ensayo, sin embargo los datos no fueron consistentes y no se registró un comportamiento deseado.

2.6. Discusión

Mediante la transformación de la cepa *E. Coli BL21(DE3)* se observó el crecimiento de colonias aisladas las cuales tenían insertado el plásmido de interés. Se puede concluir que estas células llevan el plásmido de interés debido a que estas crecieron en un medio que contenía ampicilina y solo las células con el plásmido pueden crecer en este medio, debido a que le plásmido codifica para la enzima betalactamasa capaz de hidrolizar el antibiótico. Por lo anterior, se puede decir que solo las bacterias con esta enzima pueden crecer en un medio con ampicilina porque le confiere a la célula la resistencia para poder desarrollarse en este medio.

Además, el plásmido comercial empleado es un sistema pET, que es el más poderoso sistema desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. Coli.* Los genes de interés, en este caso, el gen de la betalactamasa fue clonada en el plásmido pET bajo el fuerte control de la señal transcripcional del bacteriófago T7 (Novagen, op. Cit., 2016). Junto con la RNA polimerasa, hacen que toda la maquinaria celular sea selectiva para la expresión de la betalactamasa en cuestión.

Por medio de los controles se pudo evidenciar que con el control positivo, que consistía en un medio sin ampicilina y con la cepa *E. Coli BL21(DE3)* había crecimiento de las células, debido que estas a pesar que no están transformadas pueden crecer porque el medio no contiene ampicilina, la cual puede inhibir su crecimiento. Con lo anterior, se puede concluir que las células del cultivo inicial son viables para el crecimiento. Por otro lado, se realizó un control negativo que consistía en un medio con ampicilina donde se cultivaron células que no estaba transformadas aun. Efectivamente estas bacterias no crecieron en este medio, debido a que no tenían el plásmido en su interior que codificaba para la enzima betalactamasa. Por esto, no se evidencio crecimiento, de lo que se puede concluir que la tiene una acción bactericida y que se encuentra en buen estado para las posteriores pruebas a realizar.

Posteriormente, se realizó una prueba de solubilidad para encontrar cuál era la concentración y tiempo óptimo de inducción en el cual se podría proceder a la purificación. En todas las pruebas realizadas, se observa la banda azul intensa correspondiente a la enzima betalactamasa, de acuerdo al cálculo de su peso molecular realizado en ExPASy (39.7 KDa). Esta banda es la única que se encuentra ubicada entre las bandas del marcador de peso molecular 49.1 y 34.8 KDa. Por lo anterior, se puede afirmar que corresponde a la betalactamasa recombinante expresada, no solo por su intensidad única en el gel, sino también porque corresponde con el peso calculado de la misma y así confirmamos su identidad. Por otra parte, la banda inferior intensa en todas las imágenes corresponde a lisozima (14.4 KDa), debido a que esta enzima fue utilizada en el tratamiento de las muestras, como se describe en la sección de metodología.

De acuerdo con la figura 9, se muestra que al adicionar 1mM de IPTG, la producción de enzima insoluble es siempre mayor en las bacterias *E. Coli BL21 (DE3)* a través del tiempo evaluado, según las bandas reveladas en el gel de poliacrilamida. A las 6 y 19 horas, las bandas color azul son siempre más amplias e intensas en las fracciones insolubles proteica, a comparación de las bandas correspondientes a las fracciones solubles. Cuando se observa la figura 10, propio a una concentración de 0.4 mM de IPTG, se tiene el mismo patrón de la prueba anterior, una fracción mayor de enzima insoluble ya que estas bandas son más intensas en el gel.

Sin embargo, el análisis del gel que corresponde a una concentración de 0.2 mM de IPTG muestra que a las 19 horas de inducción la betalactamasa se encuentra significativamente en la fracción soluble, a pesar que en la fracción insoluble haya una parte aun, la banda es un poco más intensa en el poso 19 h soluble. Se puede concluir de estos resultados que a las 19 horas de inducción con una concentración de IPTG de 0.2mM en el medio de cultivo, se puede obtener la enzima betalactamasa sobreexpresada en la forma soluble mayoritariamente. Se realizó estas pruebas a 19h debido a que se deseaba que la proteína se expresara en la fracción soluble ya que en esta se encuentra la proteína en su mayoría sola.

En la fracción insoluble, en muchos casos la proteína de interés se acumula en agregados insolubles inactivos, conocido como cuerpos de inclusión, sin embargo, la eficiencia de plegamiento a una forma activa de la proteína puede ser significativamente lenta, además de contener cierto grado de impurezas y ácidos nucleicos después del proceso de purificación, y lo anterior no es conveniente para los posteriores estudios de cinética enzimática (Novagen, op. Cit., 2016). Por esto, se dificulta su purificación si se sobreexpresa en esta fase. Cabe aclarar que no se realizaron ensayos a 24h con las diferentes concentraciones de inductor debido a que en este tiempo aumenta el número de proteínas expresadas lo que hace que las bacterias se empiecen a “comer” esta fuente de energía por ausencia de nutrientes del medio del cultivo.

Conociendo la concentración y tiempo óptimo de sobreexpresión, se procedió a realizar la purificación de la enzima a un tiempo de 19h y una concentración de 0,2mM de IPTG. Mediante una recolección de alícuotas en cada paso de inducción y purificación de la betalactamasa a partir de un medio de cultivo de 100 y 500 mL de *E. Coli BL21 (DE3)*, se obtuvo los dos geles de poliacrilamida registrados en la sección de resultados. Con esto, se evidencia a tiempo cero (t_0) la presencia de bandas a diferentes pesos moleculares, lo que indica la presencia de todas las proteínas de *E. Coli.* Para las 19h después de inducir se ve una banda intensa de peso 39,7kDa que indica la sobreexpresión de la enzima de interés, además de otras bandas de diferentes pesos provenientes de otras proteínas. Después del proceso de rompimiento de membranas celulares, se analiza una alícuota que de igual manera, muestra una banda intensa proveniente de la betalactamasa según su peso molecular.

Posteriormente, en el proceso de purificación, se evidencia que en el análisis electroforético de los lavados del primer proceso (figura 12) no se observan bandas que correspondan a la presencia de betalactamasa. Lo anterior es porque la enzima se ha unido covalentemente con el níquel de la resina, lo que se denomina la tecnología Ni- NTA. El NTA (ácido nitrilotriacetico) es un quelante tetradentado adsorbente, el cual ocupa 4 de 6 sitios de enlaces a la esfera de coordinación del níquel como se muestra en la figura 15. Los otros dos sitios permiten la unión con las histidinas de la enzima a purificar.

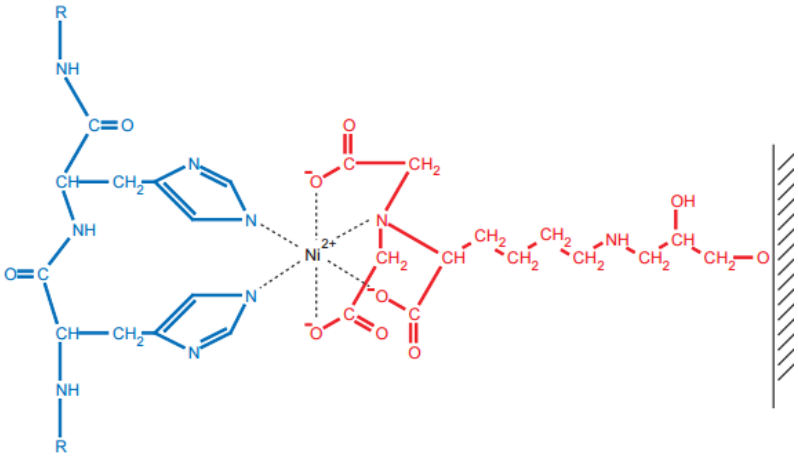


Figura 15. Interacción entre residuos vecinos en la proteína con cola de histidinas y la matriz Ni-NTA.

El anillo de imidazol hace parte de la cadena lateral de la histidina (figura 16). Por lo anterior, el imidazol se puede unir a la esfera de coordinación del níquel y permite que la histidina pueda unirse a la resina y por ende, la enzima también. El imidazol a bajas concentraciones puede prevenir la unión de proteínas no deseadas de baja afinidad con la resina, mientras que proteínas como la betalactamasa logran estar firmemente unidas al níquel debido a su cola de histidinas. Es por esto que los buffers de lavado tienen una baja concentración de este reactivo. La presencia de sales como cloruro de sodio en los buffers de purificación no tiene efecto en la unión en la resina, pero pueden reducir las uniones no específicas de contaminantes a la resina debido a las interacciones iónicas o hidrofóbicas no específicas (Qiagen, op, Cit., 2003).

En la etapa de elución se quiere remover toda la proteína unida a la resina. Los residuos de histidina en la cola de la proteína tienen un pKa de aproximadamente 6.0 y es protonado si el pH se reduce a 4.5 – 5.3. Bajo estas condiciones la proteína pierde la unión con la resina (Qiagen, op, Cit., 2003). Sin embargo, al aumentar la concentración de imidazol a 250 mM en el buffer de elución, las enzimas pierden la afinidad con el níquel debido a que ellas no pueden competir por los sitios de unión con la gran concentración de imidazol presente.

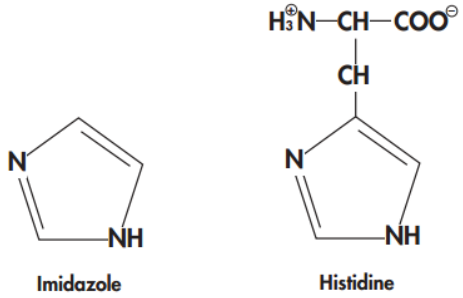


Figura 16. Estructura química del imidazol e histidina.

Sin embargo, con todas estas condiciones, el segundo proceso de purificación realizado no fue tan exitoso como el primero. Algunas proteínas eluyeron con el buffer de lavado, probablemente porque el contenido de imidazol fue mayor que hiciera que compitiera con las proteínas unidas a la columna, o algún cambio de pH pudo afectar el proceso. También se observó muchas impurezas en las fracciones de elución, posiblemente por proteínas contaminantes que fueran formas truncadas o cortadas de la betalactamasa, por proteasas en el lisado celular.

Se realizó un ensayo enzimático colorimétrico utilizando el rojo de fenol (figura 17) que es un compuesto orgánico usado en laboratorio como indicador de pH, en los medios de cultivo se utiliza como indicador de pH. A pH inferiores a 6,8, el cultivo vira a amarillo, a pH superiores a 8 el cultivo se torna de color violeta, los pH entre 6,8 y 8 dan tonalidades graduales de color naranja. Con este indicador se espera encontrar un cambio a color amarillo en una solución donde esté presente la enzima y el sustrato ampicilina, debido a que por medio de la hidrolisis de la ampicilina, causada por la enzima, se desprenden protones que acidifican el medio. Por lo anterior, el rojo de fenol tornaría amarillo. Por otro lado, cuando no hay enzima el medio se encuentra básico lo que hace que se torne rojo.

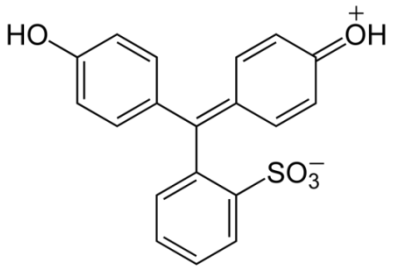


Figura 17. Estructura química del rojo de fenol

Se observó que con un ensayo control con hidróxido de sodio el medio se torna rojo. Se observa el cambio de color cuando se evalúa la actividad de la

betalactamasa en el lisado celular y cuando se ha purificado y dializado. En ambos casos hay un viraje amarillo porque el medio se torna acido debido a la hidrolisis de la ampicilina, sin embargo, en el lisado se puede evidenciar una tonalidad más anaranjada indicando una actividad reducida de la betalactamasa presente. Lo anterior se debe a que en el lisado celular se encuentran todas las proteínas de *E. Coli*, por lo que posiblemente hay proteasas que degraden enzimas como la betalactamasa. No obstante, en el tercer pozo se observa actividad catalítica de hidrolisis, confirmando así la actividad enzimática deseada de la betalactamasa recombinante.

Por otra lado, para la ejecución de los ensayos de actividad enzimática cuantitativos, no se observó el comportamiento deseado en la gráfica 3. En el ensayo con rojo de fenol, se deseaba que a medida que la concentración de sustrato ampicilina aumentará, cada recta debida tener una pendiente mayor en los primeros tiempos de reacción, debido a que se está midiendo la perdida de sustrato mediante la aparición de rojo de fenol protonado. A medida que se satura la enzima, la cantidad de sustrato hidrolizado aumenta con respecto a la cantidad de rojo de fenol protonodado formado, por eso la absorbancia debe aumentar con el tiempo y la concentración de ampicilina. Las pendientes reflejan este crecimiento de absorbancia, y como se registra en la tabla 15 ocurre todo lo contrario al comportamiento esperado, además las últimas concentraciones evaluadas muestran un valor similar en sus pendientes, comportamiento no consistente para realizar el cálculo de velocidad inicial de reacción.

Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante. Esto se denomina, estado estacionario, donde en el modelo de Michaelis y Menten es necesario para obtener los parámetros y graficas de cinética enzimática. En el estado estacionario la concentración de sustrato es constante a través del tiempo, y es por esto que el ensayo enzimático se realiza en los primeros segundos de reacción, antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda considerarse la [S] como esencialmente constante a lo largo del experimento (Stryer, Tymoczko, & Berg, 2012). En este caso se pone en duda este supuesto, y por la misma razón no hay proporcionalidad en las pendientes, ni se observa un comportamiento esperado para este tipo de ensayos. Por otra parte, es difícil obtener valores adecuados de absorbancias en los primeros 30 segundos de reacción debido a que es difícil iniciar la reacción y medir la absorbancia en tan poco tiempo, es un factor humano que se debe controlar.

De igual manera, en el segundo método de ensayo se tiene un comportamiento totalmente indeseado, por este motivo no se registró estos datos en el documento. Con estas graficas se observa que realmente hay actividad cinética a través del tiempo, pero el comportamiento no es consistente y se debe diseñar otro método experimental. Con el rojo de fenol además se tuvo complicaciones debido a que fue difícil establecer un pH fijo en solución, además era difícil garantizar que el medio conservara una estabilidad de pH porque al agregarle un buffer éste no permitiría ver el cambio de acidez en el medio debido a la hidrolisis de la

ampicilina. Por otra parte, el contenido de imidazol también podía ser un inconveniente en ambos ensayos debido a que el imidazol actúa como un tampón debido a su estructura y puede atrapar protones de hidrogeno en el medio de ensayo. Otro factor significativo es el contenido de impurezas que pudieron afectar el ensayo. El tiempo que se dejó guardada la enzima antes de realizar los ensayos también pudo ser un factor en contra, la enzima pudo ser degradada en ese intervalo de tiempo. Los ensayos efectuados funcionan de forma cualitativa para detectar actividad de Betalactamasa pero no para cuantificar y mucho menos obtener parámetros cinéticos.

2.7. Conclusiones

Los resultados obtenidos fueron acordes a la metodología diseñada. Fue planteada desde proyecto de grado I y se realizó con rigor científico y experimental. La betalactamasa se purifico con éxito en el primer proceso, sin embargo en muy poca concentración para realizar los ensayos de actividad cinética. En la segunda oportunidad se obtuvo mayor concentración de betalactamasa al aumentar el volumen de cultivo bacteriano, pero no con una pureza deseada. Sin embargo, se comprobó su actividad y que el método de producción de la misma fue exitoso. Se tienen herramientas para aumentar la producción de una proteína o enzima de interés mediante sistemas biotecnológicos. Este proyecto fue un estudio preliminar para obtener datos experimentales del proceso de purificación y ensayos de actividad cinética. En el futuro pueden escalar este proceso, hacer un medio de cultivo de un volumen mayor y purificar la betalactamasa con una concentración considerable. El diseño de la metodología para los ensayos enzimáticos tuvieron muchas falencias, y por cuestiones de tiempo de trabajo no fue posible mejorar, sin embargo se espera que en el futuro se plantee ensayos enzimáticos con reactivos más acordes, como la utilización de sustratos cromogénicos.

2.8. Recomendaciones

Para el futuro proyecto que se desarrolle se pueden tomar los datos experimentales descritos para hacer un escalamiento del proceso. Utilizar el fermentador dispuesto en la Universidad Icesi, permitirá tener un sistema que proporciona un ambiente biológico óptimo para un mayor volumen de medio de cultivo. Además, se debe diseñar un método para calcular los parámetros cinéticos de reacción enzimática, con sustratos cromogénicos como la Nitrocefina, que al ser hidrolizados por la betalactamasa cambia de color de amarillo a rojo y esto puede ser fácilmente medible en el espectrofotómetro a través del tiempo. Además, es recomendable según nuestra experiencia, que se hagan las mediciones de actividad enzimática de manera pronta luego de la purificación de la enzima, debido a que si se deja pasar algunas semanas puede perder actividad.

2.9. Bibliografía

Babic, M. A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on betlactamases. *Drug resist*, 105-109.

Babic, M., Hujer, A., & Bonomo, R. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*, 142–156.

Benedetta Allegranzi, M. S. (2011). Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *THE LANCET*, 228–241.

Bush, K. (2001). New β-lactamases in gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*, 1085–1089.

Carrasco, M., & Sandoval, G. (2015). Análisis bioinformático de las enzimas novedosas NMAN1 y NMAN2 de Trichomonas vaginalis involucradas en el control epigenético. . *Ágora*, 158-163 .

CIDEIM. (7 de 11 de 2016). *Centro internacional de entrenamiento e investigaciones medicas*. Obtenido de http://www.cideim.org.co/cideim/es/investigacion/enfoquesdeinvestigacion/resistencia-bacteriana.html

Díaz, M., Hernández, J., Martínez-Martínez, L., A, J. R.-B., & (GEIH), g. d. (2009). Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles. *Enferm Infecc Microbiol clin.*, 503-510.

GE Healtcare. (11 de November de 2012). *Recombinant protein purification: principles and methods.* Obtenido de www.gelifesciences.com/protein-purification

Gee, M. (29 de abril de 2016). *ACADEMIA .* Obtenido de http://www.academia.edu/4492247/TRASFORMACION_BACTERIANA_final

Gilman, G. y. (2006). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.* Nueva York: McGraw-Hill.

Goméz, G. (2010). *Indicadores de pH*. Obtenido de Facultad de Química UNAM: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/12.IndicadoresdepH_9152.pdf

Grupo para el Estudio de la Resistencia a Antibioticos en Medellín (GERMEN). (10 de abril de 2013). *Perfiles de sensibilidad a antiobioticos de Enterobacter Cloacae.* Obtenido de http://www.grupogermen.org/pdf/enterobacter.pdf.

Invitrogen . (2010). *Champion™ pET SUMO Protein Expression System.* Carlsbad: Corporate Headquarters.

Lejeune, A., Vanhove, M., & Matagne, A. (2001). Quantitative analysis of the stabilization by substrate of Staphylococcus aureus PC1 β-lactamase. *Chemistry & Biology*, 831–842.

Lenardis, F. (30 de Junio de 2014). *Diálisis Como Técnica de Purificación de Proteínas*. Obtenido de https://prezi.com/hgu60ubgwwxa/dialisis-como-tecnica-de-purificacion-de-proteinas/

Lomonte, B. (27 de Noviembre de 2016). *Electroforesis en gel de poliacrilamida*. Obtenido de http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/lab-bioq-gen/archivos/Lomonte%20-%20Cap13%20PAGE.pdf

Manuel Guzmán Blanco, J. A. (Julio de 2014). Extended spectrum β-lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, págs. 421–433.

Nordmann, P., & Poirel, L. (2012). Rapid Detection of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 1503 - 1507.

Organization, W. H. (2011). *Guidelines on public health.* WHO.

Qiagen. (2003). *The QIAexpressionist .* Qiagen worldwide.

Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance. *J. infect*, 1079-1081.

S.A. Sangare, A. M.-L. (2015). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from blood cultures in Africa. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 374-382.

Sarah M. Drawz, R. A. (2010). *CLINICAL MICROBIOLOGY*, 160–201.

Stryer, L., Tymoczko, J., & Berg, J. (2012). *Biochemistry .* New York: W. H. Freeman and Company.

Universidad Icesi. (2016). Practica 2: Cuantificación de proteínas. *Laboratorio de enzimologia*. Santiago de Cali.

Walsh, T. (2008). Clinically significant carbapenemases: An update. *Curr Opin Infect Dis*, 367-371.

Wong, C., Sridhara, S., & Bardwell, J. C. (2000). Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques*, 426-432.

ANEXOS

Tabla 16. Preparación de gel de corrida de electroforesis SDS PAGE al 15%

Reactivo	Volumen (mL)
Poliacrilamida 40%	3.75
Tris 1.5M (pH 8.8)	2.5
Persulfato de amonio 10%	0.1
SDS 10%	0.1
TEMED	0.004
Agua	3.55
Volumen Total	10

Tabla 17. Preparación de gel de apilamiento de electroforesis SDS PAGE al 5%

Reactivo	Volumen (mL)
Poliacrilamida 40%	0.75
Tris 1.0M (pH 6.8)	0.75
Persulfato de amonio 10%	0.06
SDS 10%	0.06
TEMED	0.006
Agua	4.38
Volumen Total	6

Preparación de azul de Coomassie

Disuelva 0.5 gramos de azul de Coomassie en 250 mL de isopropanol, adicione 100 mL de ácido acético y 650 mL de agua desionizada.

Preparación de solución para desteñir los geles

Mezcle 100 mL de ácido acético con 900 mL de agua desionizada.