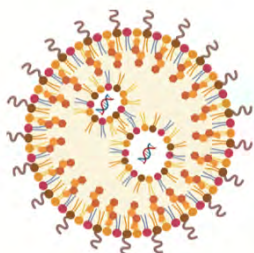




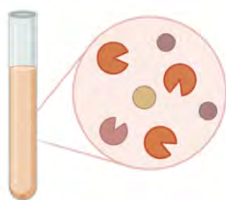
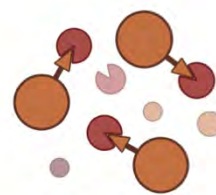
VIII Congreso

de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas

5 - 7 DE NOVIEMBRE 2023



Memorias del VIII Congreso de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas



Juriquilla, Querétaro, México



COMITÉ ORGANIZADOR

Joel Ireta (UAM-I)
Mayra Avelar (UAZ)
Armando Hernandez (IQ-UNAM)

Marcela Ayala (IBt-UNAM)
Carmina Montiel (FQ-UNAM)
Edgar Morales (CINVESTAV)

redproteinas@gmail.com

<https://redproteinas.org>



@redproteinas



redproteinas_mx



Red Estructura, Función y Evolución de Proteínas

I Proteins

equiver

CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas

Congreso de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas



PROGRAMA GENERAL

| | DOMINGO 5 DE NOVIEMBRE Auditorio Hotel Misión Juriquilla | | LUNES 6 DE NOVIEMBRE Auditorio campus Juriquilla, UNAM | MARTES 7 DE NOVIEMBRE Auditorio campus Juriquilla, UNAM |
|-------------|--|---------------|---|---|
| 9:00-12:00 | | 9:00-9:30 | CONFERENCIA 1 Daniel Rodriguez Catálisis y Break PET | CONFERENCIA 5 Jaime Ortega CINVESTAV |
| | | 9:30-10:00 | CONFERENCIA 2 Faruck Morcos Universidad de Texas | CONFERENCIA 6 Jorge Alberto Rodríguez González, CIATEJ |
| | | 10:00-11:00 | PLENARIA 3 David Savage University of California Berkeley | PLENARIA 5 Eleonora Campos Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria |
| | | 11:00-11:20 | COFFEE BREAK | COFFEE BREAK |
| | | 11:20-11:40 | ORAL 8 Gustavo Titaux, CSIC | ORAL 15 Alejandra Bravo, IBt- UNAM |
| | | 11:40-12:00 | ORAL 9 Siseth Martínez- Caballero, IQ-UNAM | ORAL 16 Nina Pastor, UAEM |
| 12:00-14:40 | REGISTRO | 12:00-12:20 | ORAL 10 Carlos Amero, UAEM | ORAL 17 César A. Ponce Diego, FQ-UNAM |
| | | 12:20-12:40 | ORAL 11 Alejandro Sosa- Peinado, FM-UNAM | ORAL 18 Jonathan Trapala, FQ-UNAM |
| | | 12:40-13:00 | ORAL 12 Martín Tovar-Ramírez, CINVESTAV | ORAL 19 Alexey Llopiz, IBt-UNAM |
| | | 13:00-13:20 | ORAL 13 Abril Gijbers, IQ-UNAM | ORAL 20 Eddie Sánchez-Rueda, IQ-UNAM |
| | | 13:20-13:40 | ORAL 14 Wilhelm Hansberg, IFC-UNAM | ORAL 21 Alina Torres, IBt-UNAM |
| 13:40-15:00 | | COMIDA | COMIDA | |
| 14:40-15:00 | INAGURACIÓN | | | |
| 15:00-16:00 | PLENARIA 1 Eva Nogales University of California Berkeley | 15:00-17:00 | POSTERS | POSTERS |
| 16:00-16:20 | ORAL 1 José Farías Rico, CCG- UNAM | | | |
| 16:20-16:40 | ORAL 2 Francisco Olvera Lucio, IQ-UNAM | | | |



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas

Congreso

de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas



| | | | | |
|-------------|---|-------------|---|---|
| 16:40-17:00 | ORAL 3 Jessica Filisola Villaseñor, CINVESTAV | | | |
| 17:00-17:20 | ORAL 4 Melissa Morales Moreno, IQ-UNAM | 17:00-17:30 | CONFERENCIA 3 José Manuel Perez-Aguilar, BUAP | CONFERENCIA 7 César Cuevas, FQ-UNAM |
| 17:20-17:40 | COFFEE BREAK | 17:30-18:00 | CONFERENCIA 4 Sergio Rosales, FCQ, UASLP | PLENARIA 6 Rafael Vázquez Duhalt CNyN-UNAM |
| 17:40-18:00 | ORAL 5 Jessica Pérez Payán, UACJ | 18:00-19:00 | PLENARIA 4 Gerardo Corzo IBt-UNAM | |
| 18:00-18:20 | ORAL 6 Oscar Rodríguez-Lima, FM-UNAM | | | CLAUSTRACIÓN |
| 18:20-18:40 | ORAL 7 Carlos Trasviña-Arenas, CINVESTAV | | | |
| 18:40-19:40 | PLENARIA 2 Miguel Alcalde Instituto de Catálisis, CSIC | | | |
| 19:40-21:00 | TAQUIZA + PREMIACIÓN Concurso de Memes de Proteínas | | | |



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



Congreso de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas



PATROCINADORES DEL VIII CONGRESO DE FÍSICOQUÍMICA, ESTRUCTURURA Y DISEÑO DE PROTEÍNAS



CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Casa abierta al tiempo



Cinvestav

equiver



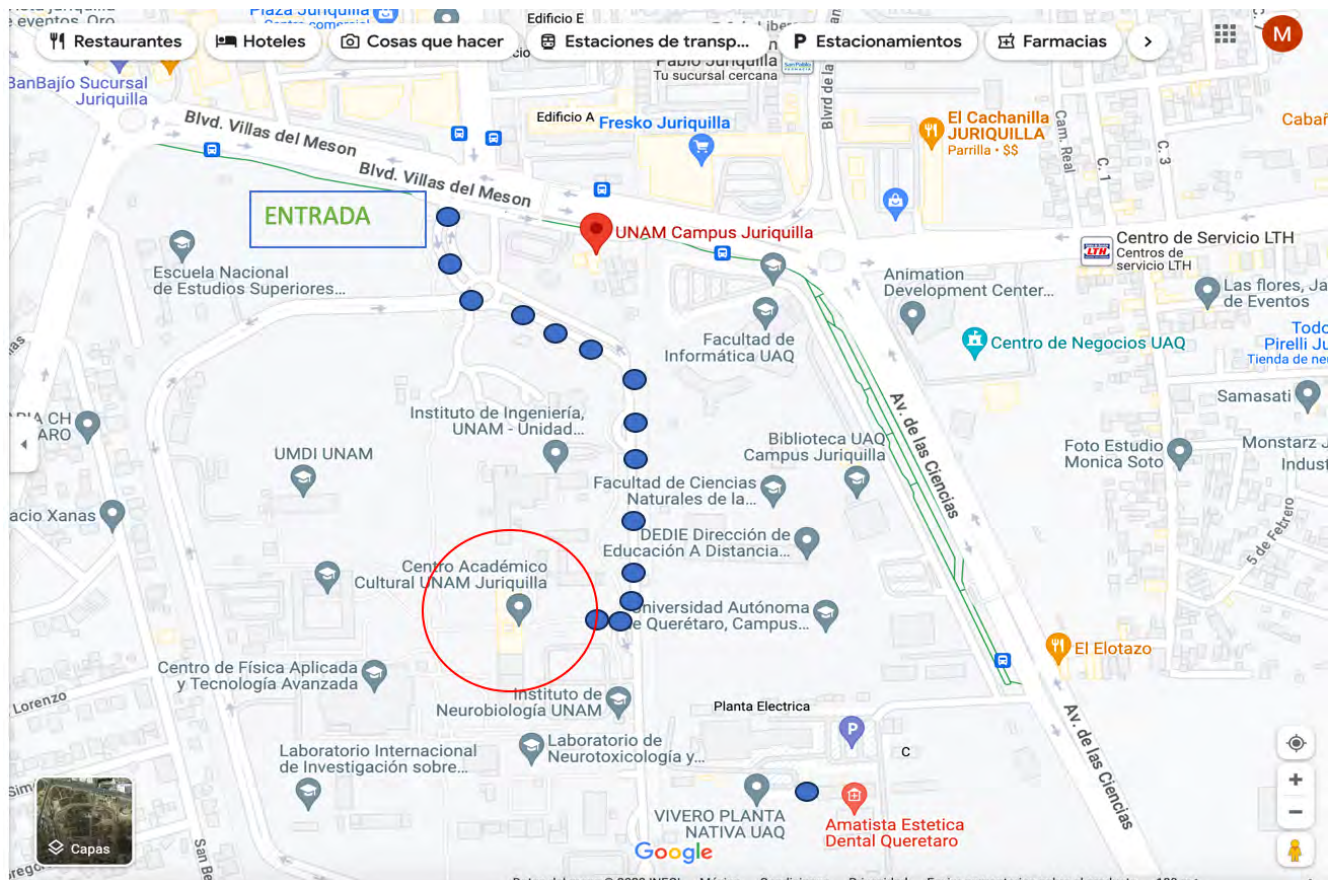


Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas

Congreso de Fisiología, Estructura y Diseño de Proteínas



ACCESO AL AUDITORIO EN EL CENTRO ACADÉMICO CULTURAL DEL CAMPUS JURIQUILLA, UNAM





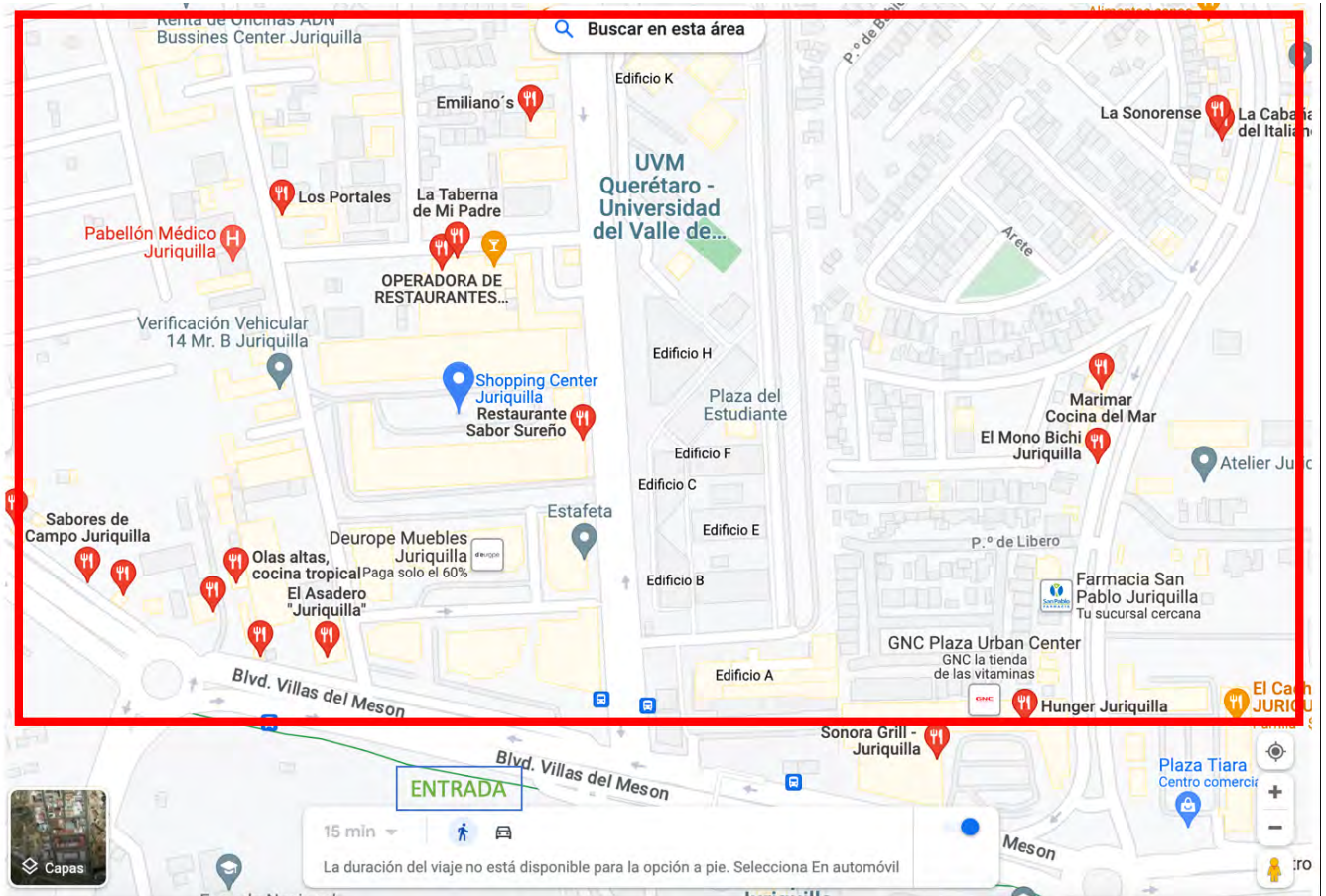
Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



Congreso de Fisiología, Estructura y Diseño de Proteínas



ZONA DE RESTAURANTES ALREDEDOR DEL CAMPUS JURIQUILLA





Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



Programa Detallado

DOMINGO 5 DE NOVIEMBRE

Auditorio Hotel Misión Juriquilla I

12:00 **Registro.**

14:40 **Ceremonia de Inauguración.**

15:00 **Plenaria 1. Eva Nogales**, University of California Berkeley, EEUU.
Structural basis for regulation of the gene silencer PRC2.

16:00 **Oral 1. José Arcadio Farías Rico**, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.
The ribosome as a selection platform for folded protein.

16:20 **Oral 2. Francisco Humberto Olvera Lucio**, Instituto de Química, UNAM.
Una lectina marina en peligro de extinción, un legado de los Xifosuridos.

16:40 **Oral 3. Jessica Georgina Filisola Villaseñor**, Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV.
Identification of lysine-like ligands for human ornithine decarboxylase.

17:00 **Oral 4. Melissa Daniela Morales Moreno**, Instituto de Química, UNAM.
Implementación y mejora de un sistema CRISPR-Cas para la detección genética del SARS-CoV-2.

17:20 **Coffee break**

17:40 **Oral 5. Jessica Guadalupe Pérez Payán**, Instituto de Ciencias Biomédicas, UACJ.
RrDapE como blanco de nuevos tratamientos contra la rickettsiosis.

18:00 **Oral 6. Oscar Rodríguez-Lima**, Facultad de Medicina, UNAM.
Análisis in silico de TBP1 y TBP2 de Taenia solium: factores estructurales relacionados al reconocimiento y selectividad de caja TATA.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



18:20 **Oral 7. Carlos H. Trasviña-Arenas**, Departamento de Farmacobiología, CINVESTAV.
Plasticidad estructural y funcional del cluster [4Fe-4S] en la enzima de reparación del ADN muty de carcinogénesis a soluciones evolutivas alternativas.

18:40 **Plenaria 2. Miguel Alcalde**, Instituto de Catálisis, CSIC, España.
The golden age of directed evolution of enzymes.

19:40 **Taquiza y premiación del concurso de memes de proteínas.**

LUNES 6 DE NOVIEMBRE.

Auditorio del campus Juriquilla de la UNAM

9:00 **Conferencia 1. Daniel Rodriguez**, Catálisis y Break PE.
Diseño racional de cutinasas y Venture capital. ¿Qué hacemos todos los días en BreakPET?

9:30 **Conferencia 2. Faruck Morcos**, Universidad de Texas, EEUU.
Generative methods as tools to characterize functional diversity, evolution, and design in protein sequence space.

10:00 **Plenaria 3. David Savage**, University of California Berkeley, EEUU.
Structure and function of the bacterial carbon concentrating machinery.

11:00 **Coffee break**

11:20 **Oral 8. Gustavo Titaux**, Instituto de Química Física Blas Cabrera, CSCI, España.
Explorando la dinámica conformacional del motivo rhim en la formación de amiloides.

11:40 **Oral 9. Siseth Martínez-Caballero**, Instituto de Química, UNAM.
Molecular basis of study of new antibiotics to fight antibiotic resistance.

12:00 **Oral 10. Carlos Amero**, Centro de Investigaciones Químicas, UAEM.
Identification of intermediates in the aggregation pathway of immunoglobulin light chains.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



12:20 **Oral 11. Alejandro Sosa-Peinado**, Facultad de Medicina, UNAM.

Diseño de interacciones proteína-proteína a través de herramientas de inteligencia artificial.

12:40 **Oral 12. Martín E. Tovar-Ramírez**, Departamento de Química, CINVESTAV.

Metals and cataracts: dissecting the molecular mechanisms of metal induced aggregation of betab2-crystallin.

13:00 **Oral 13. Abril Gijbers**, Instituto de Química, UNAM.

Huella digital por rayos X revela un mecanismo de comunicación de largo alcance en la proteína EFL1 y su alteración por una mutación clínica.

13:20 **Oral 14. Wilhelm Hansberg**, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Las catalasas de subunidad grande también son chaperonas.

13:40 **COMIDA**

15:00 **POSTERS**

17:00 **Conferencia 3. Jose Manuel Perez-Aguilar**, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.

Using computational methods to understand the ligand binding mode and conformational consequences in membrane protein.

17:30 **Conferencia 4. Sergio Rosales**, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

Diseño y evaluación de proteínas multiepitópicas para la generación de prototipos de vacunas contra el SARS-CoV-2.

18:00 **Plenaria 4. Gerardo Corzo**, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Neurotoxinas y enzimas en venenos de animales ponzoñosos.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



MARTES 7 DE NOVIEMBRE.

Auditorio del campus Juriquilla de la UNAM

9:00 **Conferencia 5. Jaime Ortega**, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV.
La chagasina como andamio molecular para la expresión de epitopos del antígeno vacunal TSA-1 de T. cruzi.

9:30 **Conferencia 6. Jorge Alberto Rodríguez González**, CIATEJ.
Efecto de la concentración sales en la actividad y estructura de lipasas/esterasas halófilas y halotolerantes.

10:00 **Plenaria 5. Eleonora Campos**, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
Desarrollo de xilanasas y enzimas desramificantes para la valorización de biomasa lignocelulósica residual.

11:00 **Coffee break**

11:20 **Oral 15. Alejandra Bravo**, Instituto de Biotecnología, UNAM.
La formación de poro de las toxinas CRY de Bacillus thuringiensis involucra cambios conformacionales drásticos en las hélices-alfa del extremo n-terminal de la toxina.

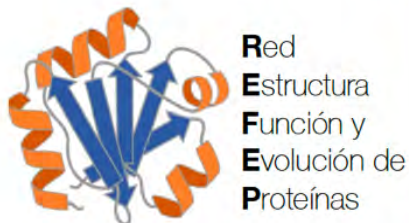
11:40 **Oral 16. Nina Pastor**, UAEM.
Molecular underpinnings for the asymmetry of Cre binding to LoxP.

12:00 **Oral 17. César A. Ponce Diego**, Facultad de Química, UNAM.
Diseño de regiones desordenadas sintéticas sensibles a los cambios en las propiedades fisicoquímicas del ambiente.

12:20 **Oral 18. Jonathan Trapala**, Facultad de Química, UNAM.
Estudio estructural de la inulinasa ISO3 Kluyveromyces marxianus.

12:40 **Oral 19. Alexey Llopiz**, Instituto de Biotecnología, UNAM.
Papel de un lazo sobresaliente del dominio b en la especificidad de reacción de la α -glucanotransferasa de Thermotoga maritima.

13:00 **Oral 20. Eddie Guillermo Sánchez-Rueda**, Instituto de Química, UNAM.
Desarrollo de nanopartículas de proteína con actividad antimicrobiana.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



13:20 **Oral 21. Alina Torres**, Instituto de Biotecnología, UNAM.
Functional expression of a novel peroxygenase from Sphaerobolus stellatus.

13:40 **COMIDA**

15:00 **POSTERS**

17:00 **Conferencia 7. César Cuevas**, Facultad de Química, UNAM.
La sensibilidad estructural al ambiente de proteínas intrínsecamente desordenadas.

17:30 **Plenaria 6. Rafael Vázquez Duhalt**, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM.
Diseño de nanorreactores enzimáticos para fines terapéuticos.

18:00 **Clausura**

Posters

LUNES 6 DE NOVIEMBRE, 15:00 a 17:00.

Vestíbulo del auditorio del campus Juriquilla de la UNAM

1. **Daniel Balleza Mejía, BB, ITV.** Transiciones helicoidales y flexibilidad intrínseca en canales trp y kv
2. **Reinier Felipe Cárdenas Mena, CIQ, UAEMor.** Aggregation pathways of Human Gamma S Crystallin induced by metal ions.
3. **Javier Sebastián Cazares Benitez, FM, UJED.** Caracterización bioquímica, cinética y termodinámica de la 3-dehidroquinato deshidratasa de Staphylococcus aureus resistente a meticilina.
4. **Teresa Beatriz Nava Ramírez, IBT, UNAM.** El papel de las regiones intrínsecamente desordenadas en la actividad del factor transcripcional RTG1 en la respuesta a estrés hiper-osmótico en levadura.
5. **Gabriel Eduardo García Laiton, LaBioSEM, UCol.** Caracterización estructural y funcional de la primera cicloglucanotransferasa de 4 dominios FABC del género Vibrio.
6. **Hariel Gaytan Reyes, CIQ, UAEMor.** Integración de datos experimentales y métodos computacionales para ayudar y enriquecer la interpretación.
7. **Jorge Alejandro Pérez Niño, FM, UNAM.** Caracterización fisicoquímica de triosafosfato isomerasas ancestrales obtenidas mediante diferentes métodos de reconstrucción.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



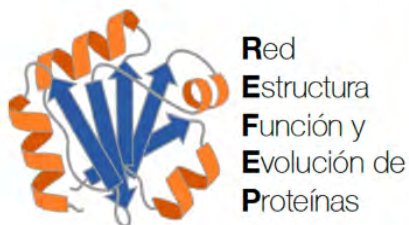
8. **Georgina Garza-Ramos, FM, UNAM.** Estudios sobre la divergencia cinética y estructural de las nitrilasas.
9. **Sharo Maciel Rosas Cruz, IQ, UNAM.** Expresión, purificación y caracterización de ami1 y cwlm de m. Tuberculosis.
10. **Paola Fernanda Montero Juárez, IQ, UNAM.** Clonación, expresión y purificación de las amidasas 3 y 4 de M. tuberculosis.
11. **Salomón Alvarado Cardona, CQ, UAZ.** Metalotioneínas en biorremediación de suelos mineros y su uso en la recuperación de metales de valor comercial.
12. **José Félix Rojas Cabeza, CTAOA, CIAD.** Interacción entre naftalendiimidias y ácidos naftóicos con arginina cinasa de *Rhipicephalus sanguineus*.
13. **Ana Karina Segovia Parra, FM, UJED.** Inhibición de la ptp1b. Obtención de moléculas bioactivas para el diseño de un nuevo fármaco para la diabetes tipo 2.
14. **Regina Guerrero Zavala, IQ, UNAM.** Clonación, expresión y purificación de la proteína NamH de *Mycobacterium Tuberculosis*.
15. **André Borges Farias, UNAM.** An in silico prediction of interaction of invf - rnap is mediated by the chaperone sica in *Salmonella* sp.
16. **Luis Janiel Navarro González, BB, Cinvestav Zacatenco.** Co-crystallization of human ornithine decarboxylase with lysine analog ligands.
17. **Berenice Núñez Salas, CQ, UAZ.** Estudio *in silico* de la capacidad de oxidación de carbamazepina por la variante aaeupo-pada-l.
18. **Andrés Sebastián Rodríguez Tapia, CQ, UAZ.** Estudio de moléculas de origen natural como potenciales inhibidores de la proteína espiga del sars-cov-2.
19. **Jeanette Loera Rubalcava, IQ, UNAM.** Una nueva familia de lectinas con especificidad por ácidos urónicos
20. **Rogelio Rodríguez-Sotres, FQ, UNAM.** The in silico study of the phosphate-starvation-2 enzymes from terrestrial plants reveal their strong structural similarity to Human phosphocholine/phosphoethanolamine phosphatase and to bacterial MtnX phosphatase.
21. **Jessica Loera Rubalcava, IQ, UNAM.** Estudio de la oligomerización de una lectina del mejillón *Mytilus californianus*.
22. **Claudia Martínez Anaya, IBT, UNAM.** Historia evolutiva de la interacción entre nrc3, un componente del sistema de inmune vegetal, y sprysec15 de *Globodera rostochiensis*.
23. **Alondra Saucedo Hernández, CQ, UAZ.** Manganese peroxidase and the engineering of proteins: an enzyme with potential use in bioremediation.
24. **David Orbe, DQ, UAMI.** Protein structure: an approach through dual quaternions
25. **Brenda Paola Gutiérrez Soto, UJED.** Obtención, caracterización cinética y estructural de moléculas pequeñas capaces de inhibir a la proteína fosfatasa de tirosina 2 que contiene el dominio homólogo SH2.
26. **Karim Romero Rangel, DQ, Cinvestav Zacatenco.** Purification of receptor binding domain of sars-cov-2 b1.1.529 (omicron) and its subsequent detection with nanobodies.
27. **Salomón de Jesús Alas Guardado, CNI, UAM.** Estudio de la estabilidad térmica de la proteína hpr del organismo termófilo *B. Stearothermophilus* por dinámica molecular.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



28. **César Alberto González Guzmán, IBT, UNAM.** Estudio estructural de la betalactamasa TLA-1 en complejo con tazobactam.
29. **Benjamín García Ramírez, IQ, UNAM.** Bases biofísicas y estructurales de la interacción IgE - profilina
30. **Jesús Manuel López Meza, IBT, UNAM.** Semi-rational design of a Cytochrome P450 BM3 Library for p-Coumaric Acid Hydroxylation
31. **Christian Sosa, DFBN, Cinvestav Zacatenco.** La tetraspanina31 como posible receptor de adhesión neuronal de la subunidad $\beta 2$ de la Na⁺/K⁺-ATPasa.
32. **Josahandy Jiménez Peralta, IBT, UNAM.** Tamizaje de variantes de α -amilasa con actividad alcohólica mejorada para la síntesis de alquilglucósidos.
33. **Emma Liliana Arévalo Salina, IBT, UNAM.** Construcción de una proteína de unión a endoxifeno con alta afinidad y selectividad.
34. **Magally Luisa Elena Hernandez Palomares, CA, CIAD.** Diferencias estructurales en las isoenzimas de la Idh del camaron p. Vannamei.
35. **César Iván González Hernández, FQ, UNAM.** Transglucosilación enzimática de la sacarosa en mezclas eutécticas.
36. **Vania Villalobos Figueroa, FQ, UNAM.** Caracterización de la levanasa recombinante de *Bacillus velezensis*.
37. **Leonardo Isait Morales Lino, IBT, UNAM.** Diseño de enzimas desubiquitininas quiméricas con preferencia por cadenas homotípicas de ubiquitina K63.
38. **Orlando Sebastian Gómez Quintero, IQ, UNAM.** Optimización de la biosíntesis de la proteína ascas12a en *Escherichia coli*.
39. **Mónica Janett Muñoz Contreras, REMA, INECOL.** Estudio de dos metalotioneínas del hongo ambrosial y fitopatógeno, *Fusarium kuroshium*.
40. **Jesús Ortiz Saucedo, IQ, UNAM.** DESARROLLO DE BIONANOESTRUCTURAS CON DNA Y PROTEÍNAS CRISPR-Cas.
41. **Idalia Patricia García Morales, IQ, UNAM.** DESARROLLO DE UN BIOSENSOR GENÉTICO BASADO EN EL SISTEMA CRISPR-Cas PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi*
42. **Ximena del Toro Ríos, IQ, UNAM.** Entrega dirigida de RNA terapéutico a células de cáncer de mama mediante proteínas tipo virus C-S-B.
43. **Silvia Armenta Jaime, UAEH .** Estudio de enzimas lignocelulolíticas de hongos basidiomicetos de importancia en aplicaciones biotecnológicas.
44. **Sofía Tamara Gutiérrez Trejo, UAEH .** Estudio de enzimas lignocelulolíticas de hongos basidiomicetos de importancia en aplicaciones biotecnológicas.
45. **Carolina Sánchez-López , Cinvestav Sur.** Exploring the dynamic Cu²⁺-coordination to proteins and hormones with a nh₂-Hxxx motif: the case of the prion protein, neurokinin a and glucagon
46. **Manuel Terrazas-Lopez , ICB, UACJ .** Spectos estructurales y mecanísticos de la enzima dape de las bacterias eskapee.
47. **Marco Antonio Piñón Chávez, IQ, UNAM.** Desarrollo de un método de detección genética del virus del Dengue usando el sistema CRISPRCas.
48. **Yanahi Posadas, DQ, Cinvestav Zacatenco.** Dissecting the effect of amyloid beta on Cu(II)-coordination to the prion protein: Re-thinking neurotoxic mechanisms.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



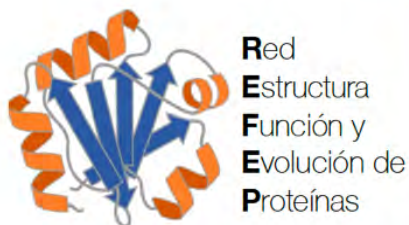
49. **Francisco Odiseo Hernández Cortés, IQ, UNAM.** Desarrollo de nanopartículas proteicas conjugadas con vancomicina.
50. **Manuel Mauricio Jasso-Ortiz, CQ, UAZ.** evaluación de derivados fluoroquinolonas con tetrazoles como inhibidores de nsp5, nsp12 y spike en SARS-Cov-2.
51. **Claudia Guadalupe Benítez Cardoza, ENMH, IPN .** Mecanismos de plegamiento de la proteína anudada leptina.
52. **Ana Ximena Medina Moreno, CQ, UAZ.** Evaluación computacional de derivados de sistemas híbridos de fluoroquinolonas con acción farmacológica en cáncer de pulmón.
53. **Jessica Zacarias Flores, IQ, UNAM.** Optimización de la detección genética del SARS-CoV-2 con el sistema CRISPR-CAS12a.
54. **César Sánchez Juárez, DQ, UAM.** Descubrimiento y optimización de inhibidores para la glutatión transferasa de *Taenia Solium* de 25.5 kDa (Ts25GST) como posibles agentes antiparasitarios.
55. **Martínez-Bahena Salvador, IBt, UNAM.** Generación semi-razional y selección de mutantes de la levansacarasa LevS afectadas en la síntesis de polímero
56. **José Alberto Parra Espinoza, IBT, UNAM.** Producción y caracterización de un heterodímero de la epóxido hidrolasa de *Pseudomonas aeruginosa*, para su uso como herramienta en la evaluación del efecto de la capacidad calorífica sobre la catálisis enzimática.
57. **Elena Lizbeth García Villegas, CIDM, UAEMor .** Structural study of lipase 2 of *Pseudomonas alcaligenes*.
58. **Kenia Iveth Pantoja Gámez, UAS.** Immunoinformatics evaluation of immunogenic epitopes of ehadh from *Entamoeba histolytica* as a vaccine candidate against amoebiasis.
59. **Dulce Carolina Lugo Gil, DB, Cinvestav Zacatenco.** Isolation of the zika virus and fragments of the human cytoplasmic dynein1 for structural studies.
60. **Diana Paola Rojas González, FM, UNAM.** Identificación de fármacos para su reposicionamiento como inhibidores de Ick en terapia contra cáncer.
61. **Rodrigo Vizuet, DBC, IPN.** Ensayo de docking molecular con 4 neurotoxinas presentes en diferentes grupos taxonómicos asociados con la enfermedad de Alzheimer.
62. **Nicole Justine Moreno Licona, BB, Cinvestav Zacatenco.** Expression of the diabetes type 2 related transporter MCT11.
63. **Arisbeth Guadalupe Almeida Juárez, IBT, UNAM.** Beyond the dimer: Oligomeric study of Catechol 1,2 dioxygenase from *Stutzerimonas stutzeri* GOM2.
64. **Octavio Martín Avilés Sánchez, FQ, UNAM.** Irreversibilidad del desplegamiento térmico y estructura residual en barriles TIM de novo.
65. **Pedro Antonio Ruiz de la Rosa, CQ, UAZ.** Hialuronidasa del veneno de abejas: producción heteróloga y posibles aplicaciones.
66. **Gustavo Abraham Valero Pibara, FQ, UNAM.** Especificidad por el sustrato aldehído de la enzima aldehído deshidrogenasa pa2125 de *Pseudomonas aeruginosa*.
67. **Brenda Belén Cruz García, IBT, UNAM.** Optimización de biosíntesis de proteína tipo virus fusionada a péptidos bioactivos.
68. **Edna Alejandra Ortiz Castañeda, FQ, UNAM.** Producción y caracterización de la inulinasa recombinante de *Bacillus velezensis*.
69. **Victor Eulogio López Guerrero, DFBN, Cinvestav Zacatenco.** A copper-chelating peptide with therapeutic potential against Alzheimer's disease: cellular and molecular effects.
70. **Edgar López Pérez, CNI, UAM.** Estudio de la estabilidad térmica de la subunidad b de la ATP sintasa,
71. **Ian Giovanni Estrada Reyes, UTVT .** Ingeniería de proteínas aplicada a la PET hidrolasa.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



72. **Mario Alanis García, IQ, UNAM.** Rediseño de proteínas dCas12 fusionadas con la proteasa del virus grabado del tabaco para detección de ADN.
73. **Jimena Berenice Valdez Cabral, CQ, UAZ.** Modelado computacional para el reposicionamiento de fármacos como potenciales inhibidores para la diana CTSK.
74. **Eduardo Alejandro Orozco Flores, CQ, UAZ.** Propuesta de reposicionamiento de fármacos y nuevas opciones para el objetivo terapéutico de la quinasa por medio de técnicas de modelado computacional.
75. **Pavel Andrei Montero Dominguez, IBT, UNAM.** In silico design and recombinant production of a peptide with antinociceptive potential inspired by a toxin from the *Centruroides elegans* scorpion.
76. **Kenia Lisceth García Barrera, IBT, UNAM.** Expresión y purificación de una neurotoxina consenso proveniente de venenos de elápidos.
77. **Victor Carpanta, IBT, UNAM.** Expresión heteróloga de variante de una neurotoxina consenso de elápidos y su capacidad inmunológica.
78. **Erandi Salas Romero, FM, UNAM.** Una nueva perspectiva de los mecanismos de evolución de proteínas por selección natural y deriva génica.
79. **Daphne Garcia Carrillo, UAS.** Structural analysis of the cd63-syntenin-1-alix complex for post-endocytic trafficking of hpv: a dynamic simulation and molecular docking.
80. **Juan Pablo Martínez Sáenz, INECOL.** Diseño y caracterización de péptidos antimicrobianos por medio de simulaciones de dinámica molecular.
81. **Ninfa Jiménez Acosta, INECOL.** Compuestos Quorum Sensing de *Rhodopseudomonas Palustris* como miméticos de jasmonatos en plantas. Una aproximación in vitro e in silico.
82. **Areli Gutiérrez Martínez, FCB, UJED.** Comparación de la composición bioquímica y la actividad biológica del veneno de *Crotalus basiliscus*, *Crotalus molossus molossus* y *Crotalus molossus oaxacus*.
83. **David Hernández Herrera, ENCB, IPN.** Estructura y filogenia de subunidades a y b de crotoxina.
84. **Eusebio Raul Uc Santos, DQ, Cinvestav Zacatenco.** La S-glutacionilación de la cristalina γ D humana disminuye la agregación inducida por Cu(II) e impide su reducción a Cu(I) in vitro.
85. **Bruno Rodríguez Lopez, UJED.** Caracterización genómica del veneno en el complejo *Crotalus molossus*: un enfoque pangenómico.
86. **Kayley Aileen Hernández Ramírez, UAEH.** Análisis in silico de hot spots en polimerasas replicativas y su relación con cáncer de tipo ginecológico.
87. **Jessica Andrea Badillo Mata, CIATEJ.** Expresión de una proteína biespecífica basada en dominios vna: caracterización preliminar in silico.
88. **Rafael García Gómez, BB, ITESM.** Evolución de BL230 y XylF para optimizar la degradación de catecol en biofábricas no-patógenas.
89. **Gala Rocio López Herrera, DB, UNAM.** El papel de los aminoácidos cargados en la sensibilidad estructural de una proteína intrínsecamente desordenada de tardígrados ante choque hiperosmótico *in vivo*.
90. **Lluvia Iveth Rios Soto, FM, UJED.** Inhibición de la shikimate cinasa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina por derivados de bencimidazol. Estudios in vitro e in silico.
91. **David Pascual Galván, ENCB, IPN.** Diseño y expresión de anticuerpos biespecíficos contra variantes de preocupación de SARS-COV-



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



MARTES 7 DE NOVIEMBRE, 15:00 a 17:00.

Vestíbulo del auditorio del campus Juriquilla de la UNAM

92. **Danny G. Madrigal Ceballos, FM, UNAM.** Natural history and functional diversity of aldehyde dehydrogenase superfamily in archaea.
93. **Leticia Ramírez Silva, FM, UNAM.** El dominio c-terminal extra que posee la piruvato cinasa de thermoplasma acidophilum estabiliza su conformación activa.
94. **Juan Carlos Santiago Jiménez, ESFM, IPN Zacatenco.** Caracterización mecánica-cuántica del dominio de unión al receptor (rbd) de la proteína spike de tipo salvaje del sars-cov-2 útil para el desarrollo de nuevas biotecnologías.
95. **Gloria Hernández Alcántara, FM, UNAM.** El dominio B como monitor de cambios estructurales en las piruvato cinasas de *Vibrio cholerae*.
96. **Jorge Ángel Marcos Viquez, FM, UNAM.** Nuevo sitio alostérico en las GlcN6P desaminasas con plegamiento SI.
97. **María Alicia Vega Segura, DB, UNAM.** Parte i: mecanismo que utilizan las piruvato cinasas de crenarchaeotas para alcanzar su conformación activa.
98. **Arianna Duque Ortiz, BB, IPICYT.** Functional characterization of a novel udp glycosyltransferase from *Nicotiana tabacum*.
99. **Kimberly Castañeda Gutiérrez, CIQ, UAEMor.** Caracterización de la interacción inhibidor – cristalina gamma s.
100. **Guillermo Salcedo Barrientos, FM, UNAM.** Parte II: mecanismo que utilizan las piruvato cinasas de crenarchaeotas para alcanzar su conformación activa.
101. **Alma Jessica Díaz Salaza, FQ, UNAM.** Structural Thermodynamics of bacterial Triosephosphate Isomerases complexed with a transitionstate analog.
102. **Luis Brieba, Langebio, Cinvestav Irapuato.** El primosoma mitocondrial de arabidopsis.
103. **Yan Carlos Leyva Labrador, CICESE .** Diseño computacional de péptidos estructurados: resultados preliminares.
104. **Carlos Alberto Oliva Moreno, CICESE .** Empleo de ESMFold en un Algoritmo Genético para el diseño de una proteína a partir de un esqueleto polipeptídico determinado.
105. **Naxhie López-Reyes, Langebio, Cinvestav Irapuato.** Promiscuidad bi-sustrato de la isomerasa fosforribosil antranilato (pria) en un contexto de modelos metabólico-matemáticos a escala genómica.
106. **Juan José de Jesús Gómez Castro, CNI, UAM.** Análisis de mecanismos moleculares de la termoestabilidad de la histona rhmfa por dinámica molecular.
107. **Placido Rojas Franco, ENCB, IPN.** Estudio del acoplamiento molecular de ligando-receptor, de ficocianobilina con receptores que participan en el mantenimiento de la hipertensión arterial.
108. **Alonso Alexis Lopez Zavala, Uson.** Inmunoreactividad a IgE de la arginina cinasa del cangrejo café *Callinectes bellicosus*.
109. **José Alberto Escobar Cázares, IQ, UNAM.** Impacto de la cooperatividad entre los dominios regulatorios sh y el dominio catalítico tk de la tirosina cinasa abl en su estabilidad estructural y su capacidad de reconocer ligandos farmacológicos.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



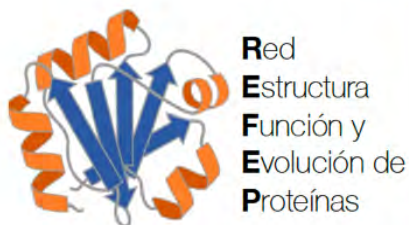
110. **Luis Alberto Caro Gómez, ENMH, IPN.** Identificación de nuevos compuestos contra la proteína antiapoptótica BCL-2 mediante estudios de acoplamiento molecular.
111. **Alejandra A. Covarrubias Robles, IBT, UNAM.** Alternative conformations of an intrinsically disordered protein associated to its in vitro activity.
112. **Vanesa Montserrat Varela Ortiz, CQ, UAZ.** ¿Cómo intervienen las proteínas en la enfermedad neurodegenerativa alzheimer?
113. **Erika Yaret Durazo García, FCQB, Uson.** Arginina cinasa de la jaiba café (*Callinectes bellicosus*): mapeo de epítomos potencialmente alergénicos.
114. **Marco Ibrim Rodríguez Sánchez, DB, Cinvestav Zacatenco.** Mutación de la chagasina de *Trypanosoma cruzi* para incrementar su expresión soluble en *Escherichia coli*.
115. **Paola Eugenia Agustín Vélez, DB, Cinvestav Zacatenco.** Diseño bioinformático de proteínas quiméricas de chagasina con 3 y 4 epítomos de tsa-1, posible antígeno vacunal contra chagas.
116. **Carlos Daniel Flores León, FQ, UNAM.** Determinación del efecto de mutaciones de resistencia a orizalina en *Toxoplasma gondii* empleando métodos computacionales.
117. **Darinka Pamela Durán Gutiérrez, ENMH, IPN.** Evaluación del impacto de variantes en la expresión y actividad de la ALFA-liduronidasa humana.
118. **Gerardo Flores Pacheco, IBT, UNAM.** Hialuronan sintasa de *Pasteurella multocida*: Bases moleculares del reconocimiento al sustrato UDP-N-acetilglucosamina.
119. **Alexis Omar Campuzano González, BB, UNAM.** Estructura del complejo proteasa – inhibidor entre tripsina y M271. Nuevo mecanismo de inhibición.
120. **Anabel Félix Arredondo, DCQBA, USon.** Implicaciones de residuos no catalíticos en la estructura y actividad de la badh de riñón de cerdo.
121. **Ligia Vega Becerra, DGBM, IPICYT.** La proteína G0S2, análisis de interacción del complejo G0S2/BCL-2.
122. **María Fernanda Mata Salgado, CIC, UAEMor.** Unión de Cu(II) a la proteína 6AJL2-R24G, asociada con amiloidosis de cadena ligera. papel de las histidinas.
123. **Luis Fernando Colorado Pablo, FQ, UNAM.** Optimización basada en la estructura de derivados del carbendazim mediante cálculos de energía libre
124. **Alejandro Delgado Rey, DBM, IPICYT.** Purificación y caracterización de la lipasa TA0887 proveniente de *Thermoplasma acidophilum*.
125. **Jesús Rojas Osnaya, DCNI, UAM.** Caracterización de la actividad interfacial de la hidrofobina clase I del hongo *Agaricus bisporus*.
126. **Claudia Rodríguez Almazán, UNAM.** Identificación proteómica de enzimas de origen marino como herramientas moleculares con aplicación biotecnológica.
127. **Juan David Bermudes Contreras, ENMH, IPN.** Modelaje del canal trpv1 para la identificación de nuevos ligandos mediante cribado virtual.
128. **Jusseth Torres Miranda, CICESE.** Funcionalización de VLP del bacteriófago P22 con péptidos biomiméticos para entrega dirigida en líneas celulares.
129. **María Fernanda Huerta Anguiano, IPICYT.** Búsqueda de sitios de unión a ligandos en la proteína fabp4 por cristalografía de rayos X.
130. **Lluvia de Carolina Sánchez Pérez, DQ, UAM.** Identificación de potenciales inhibidores de Ts24GST clase sigma de *Taenia solium* mediante cribado virtual con ensemble docking.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



131. **Roberto Flores López, FM, UNAM.** Desarrollo de inhibidores específicos y de alta afinidad para la glutatión transferasa de 26 kda de *Taenia solium*.
132. **Irma Yomira Palomares Ruiz, BB, CICESE.** Biosensores amperométricos basados en mutantes de la Arg181 de la lactato oxidasa de *Aerococcus viridans*.
133. **Alondra Cisneros Sarabia, ENMH, IPN .** Estudio computacional de la interacción de las proteínas EhPC4 y EhCFIm25 de *Entamoeba histolytica*.
134. **Lorena Hernández Orihuela, IBT, UNAM.** Laboratorio universitario de proteómica
135. **Neftaly Ricardo Arroyo Encarnación, ENMH, IPN.** Clonación y caracterización de una calmodulina alergénica del polen de *Amaranthus palmeri*.
136. **Constanza Enriquez Toledo, FQ, UNAM.** Estudio de la sensibilidad estructural de regiones intrínsecamente desordenadas y su participación en la formación de condensados biomoleculares inducidos por estrés osmótico
137. **Ingrid Mercado del Río, IBT, UNAM.** Caracterización funcional de residuos presentes en la cavidad catalítica de la inulosacarasa de *L. citreum*.
138. **Efrén Mar Antonio, FQ, UNAM.** Caracterización in silico de las interacciones de fungicidas con la beta-tubulina de *Botrytis cinerea*.
139. **Sebastián Solorio Garay, IIB, UNAM.** Identificación de moléculas con potencial actividad inhibitoria de la proteína INHA de *Mycobacterium tuberculosis*.
140. **Nidia Luz Sánchez León, CCT BioMimic, INECOL.** Estudio de la proteína cerato-platanin FkCER1 del hongo *Fusarium kuroshium* e identificación de sus proteínas interactoras.
141. **Alejandro de Jesús Peñafiel Ayala, Langebio, Cinvestav Irapuato.** Plant organellar MSH1 is a displacement loop specific endonuclease.
142. **Moises Job Galindo-Pérez , DPT, UAMC.** Desarrollo y caracterización de nanopartículas de c-ficocianina/aislado de proteína de suero de leche-zeña.
143. **Manuel Andrés Velasco Saavedra, FQ, UNAM.** Diseño y optimización de inhibidores de la MAPK p38 α con potencial actividad anticancerígena.
144. **Claudia Fabiola Cortés Pedroza, IBT, UNAM.** Determinación del espacio de secuencia de la triosa fosfato isomerasa de *E.coli*
145. **José Augusto Castro Rodríguez, FQ, UNAM.** Ingeniería de proteína de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* para incrementar la degradación de poli-(etilen tereftalato).
146. **Karla Fernanda Ramírez González, FQ, UNAM.** Estudio de la termoestabilidad de la cutinasa recombinante I de *Aspergillus nidulans* (ANCUT1) expresada en *Escherichia coli*.
147. **María José Caracheo, CIBA, IPN.** Comparación de la expresión de la globulina 11S de amaranto modificada con péptidos antihipertensivos en dos cepas de *E .coli*.
148. **Carlos Jiménez Pérez, DB, UAM.** Modelado de la estructura 3d de una proteasa obtenida durante la fermentación de lactosuero con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* por métodos in silico.
149. **Michael Adán Martínez Sánchez, DQ, Cinvestav Zacatenco.** Cu(II) binding to truncated prion protein: bridging the gap between EPR spectroscopy and DFT calculations.
150. **Karina D. Garcia-Orozco, CTAOA, CIAD.** Descripción de epítopes especie-específicos de arginina cinasa de garrapata café (*Rhipicephalus sanguineus*)
151. **Samantha Barrón Huerta, FQ, UNAM.** Análisis de las propiedades fisicoquímicas de una biblioteca de regiones intrínsecamente desordenadas.
152. **Lilian González-Segura, FQ, UNAM.** Caracterización bioquímica y estructural de la uridina 5'-monofosfato sintasa de *Coffea arabica*.
153. **Jacqueline Meneses Pérez, CIBA, IPN.** Expresión de la proteína brazeína modificada en *Pichia pastoris*.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



154. **Graciela Espinosa Luna, ITV.** Análisis in silico de lipasas del termófilo *Neobacillus thermocopriae* C255
155. **Gabriel Iván Ortega López, ENMH, IPN .** Diseño de variantes de leptina con afinidad a Ob-R mejorada para tratamiento de obesidad.
156. **Verónica Ramírez Cid, CQ, UAZ.** Estudio teórico del mecanismo de reacción Eigen-Wilkins del cisplatino dihidratado fisisorbido en prototipos de grafeno.
157. **Roberto Velasco García, Fes Iztacala, UNAM.** El sitio activo de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* une a G6P como sustrato y como estabilizador estructural.
158. **Francisco Adasme Carreño, CIEAM, UCM.** Estudio de láminas β de polialanina mediante cálculos de estructura electrónica.
159. **Isai Jese Flores Lima, CIBA, IPN.** Efecto de la modificación de una proteína de amaranto en la solubilidad y en la actividad emulsificante.
160. **Arline Fernández Silva, FQ, UNAM.** Relaciones estructura-función de la aldehído deshidrogenasa PA2125 de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1 .
161. **José Armando Santana Mendoza, CIQ, UAEMor.** Búsqueda de inhibidores de la amiloidosis de cadena ligera por medio de acoplamiento molecular.
162. **Gerardo Ulises Juárez Romero, DQ, Cinvestav Zacatenco.** Estudio espectroscopico de la interacción de la proteína tau con cobre y zinc
163. **Miguel Vizcardo Cornejo, DF, UNSA.** Determinación de la correlación entre residuos de una proteína intrínsecamente desordenada.
164. **José Iván Soria Rodríguez, IPICYT.** Estructura y caracterización bioquímica del factor de transcripción clp de *xanthomonas axonopodis* y el segundo mensajero C-DI-GMP.
165. **Josué Daniel Mora Garduño, Langebio, Cinvestav Irapuato.** The plant mitochondrial homologous recombination.
166. **Jonathan Alejandro Zúñiga Domínguez, IQ, UNAM.** Interrupción de la comunicación intramolecular por la mutación R1086Q en la GTPasa EFL1.
167. **Enrique Hurtado-Bautista , FM, UNAM.** Purificación y caracterización del mecanismo de desplegamiento de AppA1, la principal fitasa de *Escherichia coli*.
168. **Laura Eespinosa Barrera, UCol.** Evaluación del efecto de la mutación S200G sobre la actividad de una cicloglucanotransferasa termorresistente con pH-modulable.
169. **Luis Gerardo Treviño Quintanilla, UPEM.** Caracterización de CadB1, una posible enzima muconato lactonizante, que participa en la degradación de ácido cloranílico en *Herbaspirillum lusitanum* TQ07.
170. **Anabel Ruiz Flores, Fes Iztacala, UNAM.** ANÁLISIS In silico DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LePrx76 sobre dos auxinas.
171. **Rogelio Iván Rosas López, FM, UNAM.** Distribución filogenética y reconstrucción de fitasas ancestrales.
172. **Mayra Alejandra Dagio Hernandez, Langebio, Cinvestav Irapuato.** Structural analysis of the *Arabidopsis thaliana* organellar genome.
173. **Edgard David Rosas Ramírez, ENCB, IPN.** Plataforma de humanización, expresión y recuperación de la afinidad de anticuerpos IgE funcionales.
174. **Ricardo Miranda Blancas, FM, UNAM.** Análisis estructural de la glutatión transferasa de 24 kDa de *Taenia solium*.
175. **Eric Edmundo Hernández Domínguez, INECOL.** Análisis bioinformático de las osmotinas de *Taxodium mucronatum*.



Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas



176. **Leonardo Sebastián Gómez-Pérez , BB, ITESM.** Análisis de interacción en la isomerización de prolinas: un enfoque basado en TVCYP2 Y HASA.
177. **Miriam Livier Llamas Garcia, BB, IPICYT.** El efecto de mutaciones puntuales sobre la estabilidad y el estado de agregación de la proteína CGI-58 de humano.
178. **Maricela Sarita Montaña Valdez, FCQB, UAS.** The role of the AT8 and AT100 isoforms of the phosphorylated TAU protein in the formation of neurofibrillary tangles and their participation in Alzheimer's disease.
179. **Trinidad Arcos, DQ, UAM.** Efecto de la molécula INHHQ en la agregación de la proteína humana gD cristalina (HgD) inducida por Cu(II).
180. **Claudia Daniela Raygoza Zamora, Langebio, Cinvestav Irapuato.** Structure-function analysis of DNA ligase VI and its role in DNA damage in plants organelles.
181. **Melchor Andrés Soto Herrera, DB, ITESM.** Evaluación in silico de péptidos de afinidad a biomarcadores proteicos para la detección temprana de nefropatía diabética.
182. **Beatriz Noyola Altamirano, CIIDIR Oaxaca.** Potencial antioxidante de hidrolizados enzimáticos de proteína de semilla de guaje (*Leucaena esculenta*).

Conferencias Plenarias

EVA NOGALES

University of California Berkeley, EEUU.

Eva Nogales is a Professor of Biochemistry, Biophysics and Structural Biology, and a Howard Hughes Investigator. The Nogales lab is dedicated to gaining mechanistic insight into crucial molecular processes in the life of the eukaryotic cell. Their two main research themes are the dynamic self-assembly of cytoskeleton during its essential functions in cell division, and the molecular machines governing the regulation of gene expression, specially at the transcriptional level. The unifying principle in their work is the emphasis on studying macromolecular assemblies as whole units of molecular function by direct visualization of their architecture, functional states and regulatory interactions. With this overall aim in mind they use electron microscopy and image analysis, complemented with biochemical and biophysical assays, towards a molecular understanding of their systems of interest.



She has won the 2023 Shaw Prize in Life Science and Medicine for pioneering structural biology that enabled visualization, at the level of individual atoms, of the protein machines responsible for gene transcription, one of life's fundamental processes.

Structural Insights into the Regulation of the PRC2 Gene Silencer

Polycomb repressive complex 2 (PRC2) is an epigenetic regulator responsible for the trimethylation of histone H3 at lysine 27. This chromatin mark leads to the silencing of key genes, an essential process for both embryonic development and the maintenance of cell identity. PRC2 function is regulated through several mechanisms, including its association with various accessory proteins and its recognition of different histone posttranslational modifications. We have used cryo-EM to shed light into the different molecular mechanisms that regulate the activity of PRC2, included how the complex can be recruited by PRC1-deposited H2A119Ub, or how its activity is stimulated by its own H3K27me3 product, leading to spread of the mark. This spreading is thought to be limited by the inhibition of PRC2 activity on nucleosomes containing H3K36me3 and H3K4me3 modifications, which localize to sites of active transcription, by a currently unknown mechanism. I will show how our cryo-EM studies reveal that the inhibition involves changes in distinct structural elements within PRC2 or at the PRC2-nucleosome interface. Our work also supports a key role for the JARID2 cofactor in modulating PRC2 activity in the presence of different histone modifications. Additionally, EZH2 has been shown recently to be automethylated in cis, leading to increased methyltransferase activity, but the mechanism was unclear. We have studied the structural implications of substrate chromatin engagement and methylation in the absence of any allosteric activator other than automethylated EZH2 to show that, in a novel chromatin- and automethylation-dependent manner, PRC2 dimerizes such that an automethylated inactive PRC2 complex serves as an allosteric activator of a second substrate-engaged PRC2. We propose that dimerization-dependent stimulation of PRC2 activity in trans, driven by EZH2 automethylation and local PRC2 concentration, represents a new mechanism to regulate the establishment of H3K27me3 heterochromatin domains.

MIGUEL ALCALDE

Instituto de Catálisis, CSIC, España.

El tema central de investigación del Dr. Miguel Alcalde se enfoca primordialmente en el diseño de enzimas por evolución dirigida para un amplio abanico de aplicaciones biotecnológicas así como en estudios de biología sintética con aplicaciones medioambientales, energéticas e industriales (<https://miguelalcaldelab.eu>).

Miguel Alcalde es profesor de investigación del CSIC y fundador de EvoEnzyme S.L. (<https://evoenzyme.com>), compañía spin-off derivada de su trabajo en el CSIC. El Dr. Alcalde es biólogo de formación, con postdoctorado en el California Institute of Technology (CALTECH) en el grupo de la Prof. Frances Arnold (premio Nobel en Química 2018) y diversas estancias posteriores en CALTECH y en la Universidad de Massachusetts-Amherst (UMASS). Coautor de más de 150 trabajos sobre diseño de enzimas y biocatálisis aplicada y 14 patentes de invención, ha dirigido 37 proyectos de investigación procedentes de fondos públicos y privados y 12 tesis doctorales. En sus labores de gestión ha actuado como gestor de la Agencia Estatal de Investigación en el área de biotecnología y ha sido coordinador de la sección de biotecnología molecular y biología sintética de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Actualmente es miembro del comité de la división de biocatálisis de la European Federation of Biotechnology (EFB).



The Golden Age of Directed Evolution of Enzymes

La evolución enzimática dirigida está viviendo una época dorada. La consolidación de métodos sólidos de creación de bibliotecas de mutantes y la aparición de ensayos fiables de cribado de alto rendimiento han permitido a científicos de todo el mundo generar proteínas sintéticas con funcionalidades que superan con creces las de sus homólogas naturales. Y lo que es más importante, la incipiente asociación entre el diseño Rosetta y los métodos de inferencia filogenética está ayudando a las empresas de evolución dirigida. En esta línea, el uso de la paleoenzimología -reconstrucción y resurrección de secuencias ancestrales- pretende abrir vías inexploradas para la evolución en laboratorio de enzimas ancestrales más promiscuas y estables.

En esta conferencia, hablaré de todos estos avances en este fascinante campo de investigación comentando varios casos prácticos de nuestro trabajo sobre ingeniería de peroxigenasas y lacasas para los sectores farmacéutico, químico y medioambiental

DAVID SAVAGE

University of California Berkeley, EEUU.

Dave is an Associate Professor of Biochemistry, Biophysics, and Structural Biology in the Department of Molecular & Cell Biology at the University of California, Berkeley and was recently selected to be an Investigator in the Howard Hughes Medical Institute. Dave was born and raised in rural Iowa. He continues to help manage his family's farm, which was recognized in 2010 as an Iowa Heritage Farm. Dave attended Gustavus Adolphus College, where he earned a B.A. in Chemistry and minored in Computer Science. He received his Ph.D. in 2007 from UCSF for his work on membrane protein structure determination with Robert Stroud. From 2007 to 2011, Dave was a Life Sciences Research Foundation fellow with Pamela Silver in the Department of Systems Biology at Harvard Medical School.

Research in the Savage Lab focuses on understanding and engineering two of the most compelling biochemical systems found in nature: genome editing and carbon-fixing enzyme machineries. Ultimately, this work seeks to develop enabling genome editing technology and apply it for improving photosynthetic CO₂ fixation in plants. For this work, Dave's research has been recognized with the DOE Early Career Program Award, an NIH Director's New Innovator Award, an Alfred P. Sloan Research Fellowship, and he was selected for the 2018 "Future of Biochemistry" issue by ACS-Biochemistry. In addition to this research, Dave is a co-creator of the Cold Spring Harbor Laboratory course on synthetic biology, a founding member of the Engineering Biology Research Consortium, and a co-founder of Scribe Therapeutics.



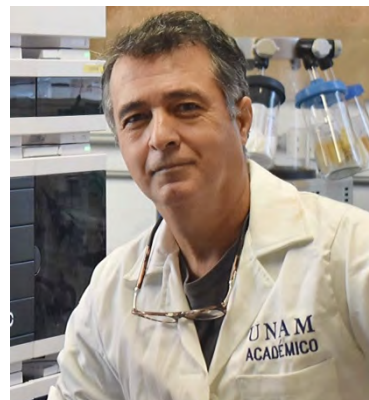
Structure and Function of the Bacterial Carbon Concentrating Machinery

Cells use structure to catalyze and facilitate the chemical reactions of metabolism. This principle is exemplified by the bacterial CO₂ concentrating mechanism (CCM), a series of biochemical reactions that facilitate CO₂ assimilation. An essential player in this process is the carboxysome, a ~100nm protein-based organelle composed of a shell that encapsulates the enzymes RuBisCO and carbon anhydrase. Despite knowledge of the overall structure of the carboxysome, little is known about the molecular interactions driving its self-assembly and function. Here, I describe our biochemical reconstitution efforts to elucidate a mechanistic picture of how the carboxysome assembles and functions in the cell. Relatedly, our lab is interested in developing a holistic picture of how carbon-assimilating physiology emerges from individual CCM activities. To this end, I will describe our efforts toward a cellular reconstitution of the bacterial CCM that serves as a 'proof by synthesis' to define activities necessary for efficient CO₂ assimilation.

GERARDO CORZO

Instituto de Biotecnología, UNAM.

El Dr. Corzo es Ingeniero en Bioquímica Industrial por la Universidad Autónoma Metropolitana. Realizó una estancia de investigación sobre Biotecnología Marina en Tsukuba, Japón. Posteriormente, terminó sus estudios de Maestría en Biotecnología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Consecutivamente, con el apoyo del programa Fullbright-García Robles, culminó sus estudios de doctorado en la Oklahoma State University. Posteriormente viajó a una estancia posdoctoral al “Suntory Institute for Bioorganic Research” en Osaka, Japón, donde al finalizar el periodo posdoctoral fue contratado como investigador asociado por cuatro años. En el 2004 se incorporó al Instituto de Biotecnología de la UNAM, donde actualmente es Investigador Titular “C” de tiempo completo en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Su trabajo en investigación se ha enfocado en el estudio de la relación estructura-función de moléculas provenientes del veneno de arácnidos, y en la expresión de proteínas ricas en puentes disulfuro provenientes de venenos de animales. Entre sus hallazgos se encuentran la descripción de neurotoxinas de estructura beta-antiparalela en el veneno de arañas que afectan el sitio-4 de los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje (Nav) en insectos, las cuales convergen de manera similar a las neurotoxinas del veneno de alacranes por dicho sitio-4. Sus contribuciones académicas se relatan en 135 artículos publicados en revistas de circulación internacional con más de 3,100 citas e índice H de 32 (de acuerdo con Scopus). El Dr. Corzo ha solicitado 17 patentes, se han concedido 10, y tres de estas han sido transferidas a la Industria. Con respecto a la formación de recursos humanos ha graduado a estudiantes de licenciatura (7), maestría (14) y doctorado (14), así como ha aportado a la formación de varios post-doctorantes. Actualmente es investigador nivel III del Sistema Nacional de Investigación.



Información adicional en la página web: <https://www.ibt.unam.mx/perfil/1546/dr-gerardo-corzo-burguete>

Neurotoxinas y Enzimas en Venenos de Animales Ponzosos

Las proteínas de los venenos de arañas, alacranes, vipéridos y elápidos son tema de investigación en nuestro grupo de investigación, por lo que primeramente obtenemos su veneno mediante “ordeña”, eléctrica o manual, y posteriormente, lo fraccionamos para conocer los tipos de proteínas de las cuales se componen. Una vez que hemos elucidado alguna proteína (péptido) de interés, nuestro trabajo se enfoca en conocer su estructura primaria, y generar cantidades suficientes de dicha proteína mediante la síntesis química, o bien ya sea por expresión recombinante para continuar con su estudio. Curiosamente, la mayoría de las proteínas relevantes que encontramos en los venenos tienen estructuras ricas en puentes disulfuro (i.e, neurotoxinas insecticidas, neurotoxinas que actúan en mamíferos, fosfolipasas, proteasas, hialurodinasa, desintegrinas), por lo que una gran parte del esfuerzo en el grupo es conocer a los aminoácidos fundamentales en el plegamiento de estas proteínas.



Dos de varias neurotoxinas recombinantes que hemos expresado y plegado satisfactoriamente son la CsslI y la ScNtx provenientes de veneno de alacrán y de elárido, respectivamente. Contrariamente a las neurotoxinas, las enzimas de víperidos que hemos expresado heterológamente no han sido plegadas satisfactoriamente, aun así para ciertos fines han sido valiosas para demostrar que pueden generar anticuerpos útiles para la neutralización de sus contrapartes nativas, y de los venenos en donde se encontraron; esto con miras a contribuir en la toxicología clínica de anti-venenos.

Volviendo a las neurotoxinas, la CsslI fue la primera neurotoxina que logramos expresar de manera recombinante, y plegar satisfactoriamente sus cuatro puentes disulfuro. La CsslI ha sido un modelo para conocer la importancia de sus aminoácidos en su interacción con los canales voltaje-dependientes de sodio, con ella se logró obtener la estructura en la cual se confirma la conexión de los mismos puentes disulfuro al igual que en la toxina nativa. Por otra parte, la ScNtx fue creada de novo por consenso de neurotoxinas similares en el veneno de varios fenotipos de eláridos (serpientes de coral, mambas, cobras y taipanes, así como eláridos marinos) y afecta los canales ligando-dependiente de acetilcolina. La ScNtx ha sido modelo para complementar antivenenos de eláridos deficientes en la neutralización de estas neurotoxinas. Por otra parte, desafortunadamente hemos tenido varios desencantos en el plegamiento de enzimas recombinantes (fosfolipasas, serino y metalo-proteasas, y hialurodinasa), en las que no hemos logrado obtener actividades similares a sus correspondientes enzimas nativas. Aun así, hemos demostrado que pueden tener una aplicabilidad alternativa en la inmunización con venenos completos para la generación de anti-venenos

ELEONORA CAMPOS

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina

Dr. Eleonora Campos is a molecular biologist with a PhD from the University of Buenos Aires, Argentina (UBA). She serves as an Independent Researcher at the National Council of Science and Technology (CONICET) and is a Professor of Advanced Microbial Genetics at the National University of San Martín (UNSaM). Dr. Campos is also the Group Leader of the "Enzymes for Agrobiotechnology Bioprocesses" (EAB) Lab at the Institute of Agrobiotechnology and Molecular Biology (IABIMO), within the National Institute of Agricultural Technology (INTA). Her research group is dedicated to exploring microbial strategies for degrading plant cell wall polymers, specifically cellulose, xylan, and lignin, and characterizing the individual enzymes involved, for potential use in bioprocesses. As a Principal Investigator, she has led numerous national and international research projects in enzymatic processes for lignocellulosic biomass valorization. Dr. Campos has authored over 40 indexed publications in the field of Microbial Enzymes Biotechnology for biofuels and bioproducts. She has also mentored several graduate and undergraduate students and is the founder of the Enzymatic Technology Network of Argentina (Red Tez). In addition, she has held positions on the boards of scientific organizations, including the Biotechnology Network of Argentina (REDBIO) and the Argentine Society for Biochemical and Molecular Biology Research (SAIB). Furthermore, Dr. Campos was a Fulbright-Nexus fellow in 2012/2013.



<https://www.researchgate.net/lab/Eleonora-Campos-Lab>;
<https://iabimo.conicet.gov.ar/enzimas-agroindustriales-para-bioprosesos/>

Valorization of Xylan in Residual Plant Biomass through Enzymatic Degradation

The valorization of the hemicellulose fraction of plant biomass plays a critical role in enhancing the sustainability of lignocellulosic biorefineries. Aerobic bacteria employ a complex array of enzymes to degrade plant cell wall polysaccharides. In this study, we focus on the extracellular proteome of two Gram-positive strains, *Cellulomonas* sp. B6 and *Paenibacillus xylanivorans*, isolated from soil. Extensive investigations were conducted to understand the culture conditions that lead to high secretion of xylanases, allowing the use of a cost-effective enzymatic extract. Furthermore, we identified the enzymes most likely responsible for this activity and expressed them in recombinant hosts to purify and characterize their enzymatic activity as well as to identify structural determinants. Additionally, we explored the specificity and synergy of xylanases in conjunction with enzymes that remove xylan decorations. I will present the results on CsXyn10A, an endoxylanase with high activity, and the synergy with CsAbf62A, an α -arabinofuranosidase, as well as CsAgu67A, an α -glucuronidase. The results obtained from these investigations enabled us to design specific enzymatic cocktails for the treatment of different lignocellulosic biomass feedstocks to produce fermentable xylose, as well as to obtain a range of substituted and unsubstituted xylo-oligosaccharides, with prebiotic potential.

RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT

Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM.

Realizó estudios de Ingeniería Química Industrial en el Instituto Politécnico Nacional, y de posgrado en Química Analítica del Ambiente en la Universidad de Ginebra en Suiza y en Ecología Humana en el Centro Europeo de Ecología Humana. Obtuvo el grado de Doctor en la Universidad de Ginebra en Suiza. Realizó una estancia posdoctoral en la Universidad de Alberta en Canadá y ha sido profesor visitante en la Universidad de Maryland y en la Universidad de California, San Diego. Es investigador emérito del SNI.



Ha publicado 193 artículos de investigación, 3 libros y 5 patentes. Sus trabajos cuentan con más de 7,500 citas y un índice H de 50 según Scopus. La empresa editorial Elsevier lo reconoció en el 2011 con el "Premio Scopus" al científico mexicano más citado en el área de Ciencias Agropecuarias y Biotecnología. En el 2009 fue reconocido por "Thomson Reuters" con el premio al artículo mexicano más citado en la década 1999-2009 el área de Microbiología. Ha recibido el Premio al Mérito Estatal de Investigación en el 2009 otorgado por el Gobierno del Estado de Morelos, el Premio Luis Elizondo en el 2007 otorgado por el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, una Mención Honorífica al Mérito Ecológico por la SEMARNAT en 2006 y el Premio Hilario Ariza Dávila en Investigación concedido en el 2005 por el Consejo de Egresados ESIQIE del IPN.

El Dr. Vázquez Duhalt fue Editor-in-chief de la revista "Biocatalysis" de la empresa alemana De Gruyter, y es miembro de los comités editoriales de 4 prestigiosas revistas científicas internacionales. Actualmente es presidente de la Academia de Ciencias de Baja California y jefe del Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM. Además, es co-director del "CaliBaja Center for Resilient Materials and Systems" del Jacobs School of Engineering, University of California at San Diego, USA".

Nanorreactores Enzimáticos Tipo Virus para Fines Biomédicos

El tamoxifeno es la quimioterapia endócrina estándar para los cánceres de mama, que requieren activación metabólica por las enzimas de la familia citocromo P450 (CYP). Sin embargo, las bajas y variables concentraciones de la actividad de CYP en el tejido tumoral siguen siendo cuellos de botella importantes para el tratamiento eficaz, y lo que provoca efectos secundarios graves. La nanomedicina ha ganado mucha atención recientemente para el tratamiento del cáncer, ya que reduce la toxicidad asociada al fármaco sin afectar la respuesta terapéutica.

Aquí mostramos el diseño modular de nanorreactores enzimáticos basados en partículas tipo virus del bacteriófago P22 para la activación de pro-fármacos combinados con la terapia fotodinámica. Estas cápsidas de virus que contienen actividad CYP en su núcleo están decoradas con fotosensibilizador y un ligando específico a receptores de estrógenos en la superficie del nanorreactor. Los nanorreactores funcionalizados con estradiol son reconocidos e internalizados en las células tumorales de mama ER+, lo que aumenta la actividad CYP intracelular y muestra la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) tras la irradiación UV365nm. Las ROS (serpientes de coral, mambas, cobras y taipanes, así como elápidos marinos) y afecta los canales generados en



Juriquilla, Querétaro 5-7 noviembre

sinergia con la actividad enzimática mejoraron drásticamente la sensibilidad al tamoxifeno in vitro, inhibiendo fuertemente las células tumorales. Este trabajo demostró claramente que el tratamiento combinado dirigido que utiliza cápsidas virales catalíticas multifuncionales representa la nanoterapia eficaz contra el cáncer de mama ER+.

Por otro lado, la Terapia de Reemplazo Enzimático (ERT) se ha utilizado para tratar algunas de las muchas enfermedades existentes que se originan por la falta o baja actividad enzimática. En la ERT se administran enzimas exógenas para hacer frente a la deficiencia de actividad enzimática. Los nanorreactores enzimáticos basados en la encapsulación de enzimas dentro de partículas tipo virus (VLPs) aparecen como una alternativa interesante para ERT. Las VLP son excelentes vehículos de administración de enzimas terapéuticas, ya que son nanoestructuras biodegradables, uniformemente organizadas y porosas, que transportan y podrían proteger el biocatalizador del entorno externo sin afectar la bioactividad. En consecuencia, se han realizado importantes esfuerzos en los procesos de producción de nanorreactores enzimáticos basados en virus y su funcionalización, que aquí se presentan.

Se discutirá el uso de nanorreactores enzimáticos basados en virus para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal como las enfermedades de Gaucher, Fabry y Pompe, así como terapias potenciales para la galactosemia y los síndromes de Hurler y Hunter.

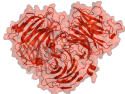


Red
Estructura
Función y
Evolución de
Proteínas

VIII Congreso de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas

Juriquilla, Querétaro 5-7 noviembre

Conferencias

We  Proteins



DANIEL RODRIGUEZ

Catálisis y Break PE

Estudió la licenciatura en Biología, cuenta con maestría y Doctorado en Ciencias bioquímicas del posgrado de la UNAM, donde se especializó en la estructura tridimensional de proteínas, así como en la producción de enzimas recombinantes. Realizó diferentes estancias de investigación en Estados Unidos y Europa. Posee experiencia en la industria farmacéutica tanto en laboratorios nacionales e internacionales como Boehringer Ingelheim y laboratorios Avimex. Fundador de las startups Catálisis y BreakPET. La última busca eliminar el problema del plástico del planeta al desarrollar enzimas capaces de degradar PET lo que permitirá implementar la primera economía circular del plástico.



Diseño racional de cutinasas y Venture Capital, ¿Qué hacemos todos los días en BreakPET?

En el 2019 se produjeron 368 millones de toneladas de plástico en el mundo y se calcula que para el 2050 se producirán 1200 millones de toneladas al año. Esto es un enorme problema porque las tecnologías actuales de reciclaje solo nos permitan recircular el 2% del plástico que producimos, por lo que cada año desechamos millones de toneladas en el ambiente, provocando daños ecológicos y de salud.

El problema de las tecnologías de reciclaje actuales es que no generan una resina reciclada con las mismas propiedades que las resinas vírgenes, por lo que, no se pueden usar para generar los mismos productos y se pierden 2/3 partes de su valor económico. Es por ello que necesitamos desarrollar mejores tecnologías de reciclaje que nos generen una resina reciclada igual a la resina virgen y así recuperar el 100% de su valor económico, solo así podremos transformar la economía lineal del plástico en una circular y sostenible.

De todos los plásticos, el PET es el que cuenta con el mayor potencial de ser reciclado y por ende es el que cuenta con mayor infraestructura de recolección a nivel mundial.

El reciclaje químico es la tecnología más prometedora para alcanzar este objetivo, consiste en romper la cadena de plástico en sus constituyentes básicos llamados monómeros, estos monómeros, se pueden purificar y volver a polimerizar para generar resinas vírgenes a partir del reciclado. Existen procesos térmicos, químicos y biológicos para realizar este tipo de reciclaje, dentro de estos el proceso biológico es el único sustentable y rentable, sin embargo, tiene la desventaja de que es un proceso que tarda semanas en completar la despolimerización, principalmente debido a la falta de especificidad de las enzimas.

Ante este problema decidimos optimizar las enzimas, realizando diseño racional de proteínas. Con esta estrategia generamos la primera enzima específica y termoestable para despolimerizar el PET, actualmente contamos con una solitud de patente del diseño de nuestra enzima y nos encontramos escalando el proceso de despolimerización.

FARUCK MORCOS

Universidad de Texas, EEUU.

Dr. Morcos is an Associate Professor in the Departments of Biological Sciences and Bioengineering (affiliate) and member of the Center for Systems Biology at UT Dallas. He joined UTD after completing his postdoctoral training at UCSD and Rice University in the Center for Theoretical Biological Physics. He received the Research Excellence Award given by the CSE Department at the University of Notre Dame for his PhD thesis and the Werner von Siemens Excellence Award to perform graduate studies at the Technical University of Munich. Dr. Morcos directs the Evolutionary Information Lab which focuses on solving problems at the interface between biology, computation, information theory and biological physics. Morcos lab develops methods to extract and analyze biological information from sequence and genomic data to create models for molecular evolution, protein structure, function, and design as well as to characterize bimolecular interactions. Recently, Morcos Lab works on machine learning approaches to study protein sequence space; as well as novel models of evolution that unify previous disjoint models of sequence change. Morcos Lab is funded by NSF and NIH grants.



Generative methods as tools to characterize functional diversity, evolution and design in protein sequence space

Characterizing the enormous space of protein sequences is an arduous task given the complex nature of the rules determining functional effects of sequence variability. The current availability of sequencing data, high throughput experiments and novel algorithms to model the joint probability of sequence composition are shifting the panorama from an intractable problem to the ability to not only characterize but also generate novel functional sequences. One example of these learning models is Variational Autoencoders (VAEs), when applied to sequence data can be useful to classify members of a protein family and generate diverse members of a given family by still satisfying higher order statistics of the training data. In our current work, we evaluate the underlying latent manifold of VAEs in which sequence information is embedded. We utilize an amino-acid Potts model like direct coupling analysis (DCA) and its sequence Hamiltonian to investigate the properties of the latent manifold. Together they constitute what we call a latent generative landscape (LGL). LGLs can be used to determine phylogenetic groupings as well as functional and fitness properties of distinct systems including the Globin family, β -lactamases, ion channels, and transcription factors. LGLs provide a guide to uncover the effects of sequence variability observed in experimental data and of directed and natural evolution of proteins. We showcase applications for protein engineering and design by combining the generative properties and functional predictive power of variational autoencoders and coevolutionary analysis.



JOSE MANUEL PEREZ-AGUILAR

Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.

José Manuel Perez-Aguilar is currently an assistant professor in the School of Chemical Sciences at the Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP) in Mexico. He received his Bachelor of Science from BUAP, and his PhD in Chemistry from the University of Pennsylvania, USA, in 2011, working with Professor Jeffery Saven.

After completing his PhD, Dr. Perez-Aguilar joined the group of Professor Harel Weinstein at Weill Cornell Medicine of Cornell University in NYC, where he studied the function of GPCRs using computational biophysical methods. Subsequently, he joined the group of Professor Ruhong Zhou at the IBM's Thomas J. Watson Research Center. During that time, he studied the interactions of proteins and nanostructures, and protein-ligand binding mechanisms.



Since 2018, Dr. Perez-Aguilar is an assistant professor at BUAP where his research interests include ligand modulation of the proteins involved in several physiopathologies using computational techniques. Until this day, Dr. Perez-Aguilar has published 62 scientific articles in international journals.

Using computational methods to understand the ligand binding mode and conformational consequences in membrane proteins.

The development of computer infrastructure and software has provided it with the opportunity to investigate complex biomolecular systems at a molecular level and under physiological conditions using computational methods. In particular, understanding protein function and the way molecular entities including lipids, ions, small molecules, and peptides module such function, remains a particularly challenging and relevant scientific endeavor. This is because changes in protein function are often associated with different pathologies. Thus, understanding how proteins are affected by ligands, could aid in the rational development of several molecular therapies. Here, using all-atom MD simulations, we investigate the possible interacting mechanism of several ligands as well as the conformational consequences of such interaction. In particular, we investigate three membrane proteins, two class A G-protein-coupled receptors activated by endocannabinoids, and a low-voltage activated T-type calcium channel. In all the cases, small molecules modulate the function of the membrane proteins. In the case of the GPCRs, suggestions about the agonistic character of a particularly relevant ligand (cannabidiol) are suggested while in the case of the calcium channel, integration with experimental results provides an interacting mechanism of a naturally occurring channel inhibitor.

SERGIO ROSALES

Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

El Dr. Sergio Rosales Mendoza es originario de Matehuala, SLP y cuenta con una Licenciatura en Químico Farmacobiólogo por la UASLP y un Doctorado en Ciencias en Biología Molecular por el IPICYT. Realizó una estancia posdoctoral en la Universidad de Illinois, E.U.A. En 2016 se integró al grupo de profesores fundadores del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, donde actualmente coordina la Sección de Biotecnología. Actualmente se trabaja en el desarrollo de vacunas empleando microalgas, células vegetales como hospederos de expresión y vehículos de entrega; así como nanovacunas. El Dr. Rosales se ha vinculado con distintas empresas con la meta de transferir las tecnologías desarrolladas.



El doctor Rosales ha publicado más de 130 artículos originales en revistas indizadas y ha dirigido 23 tesis de licenciatura, 20 de maestría y 7 de doctorado. En 2019 fue distinguido con el nivel 3 por parte del Sistema Nacional de Investigadores. Ha editado y escrito algunos libros en temas de Biotecnología médica. Ha mantenido una colaboración dinámica con distintos grupos de investigación nacionales y del extranjero, realizando estancias de investigación nacionales, así como en Alemania, Cuba, Tailandia y E.U.A. En 2018 fue distinguido por la Academia Mexicana de Ciencias con el premio a Científicos jóvenes en el área de Ciencias Naturales y en 2019 con el Premio Potosino de Ciencia, Tecnología e Innovación, en el área de Ciencias Exactas y Naturales.

Diseño y evaluación de proteínas multiepitópicas para la generación de prototipos de vacunas contra el SARS-CoV-2.

Si bien la disponibilidad de un conjunto de vacunas contra SARS-CoV-2 ha permitido inmunizar a la población en México, son muchos los factores que justifican el continuar con el desarrollo de nuevas vacunas: (i) nuestro País requiere de autonomía en la producción de vacunas, por lo que reactivar este tipo de investigación aplicada es un objetivo prioritario para enfrentar futuras pandemias, (ii) aunque la prevalencia de COVID-19 en la actualidad es baja, se estima que será necesario continuar con la administración de refuerzos para mantener la inmunidad poblacional y (iii) la eficacia de las vacunas actuales puede ser mejorada para lograr protección contra la infección y por tanto la transmisión entre individuos (inmunidad esterilizante). En esta charla se presentarán los resultados relativos al desarrollo de prototipos de vacunas contra la COVID-19 basados en proteínas quiméricas que portan epítomos lineales de la proteína espícula, las cuales se basan en acarreadores de origen bacteriano y se produjeron en *E. coli*. Dichas proteínas fueron purificadas y se establecieron los métodos para lograr su refolding, así como la caracterización de sus propiedades inmunogénicas en ratones y en primates no humanos.



JAIME ORTEGA

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV

Jaime Ortega López es Ingeniero Químico por la Universidad de Guadalajara, Maestro en Ciencias en Bioingeniería por el CINVESTAV y Doctor en Ciencias en Bioquímica por University of Texas Health Science Center at San Antonio TX. A partir de 1995 se integró al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav Unidad Zacatenco, donde es Profesor Titular y Nivel II del Sistema Nacional de Investigadores. Su área de interés es la Biotecnología de Proteínas con énfasis en la expresión, purificación y repliegamiento de proteínas recombinantes de parásitos protozoarios para su uso como herramientas para el estudio de su biología y patogenicidad, así como potenciales antígenos para el desarrollo de vacunas y/o métodos diagnósticos. El Dr. Ortega López participa en grupos multidisciplinarios dentro y fuera de Cinvestav para el estudio de estructura-función de proteínas de protozoarios parásitos de interés biomédico, en el desarrollo de nuevos tratamientos y métodos de diagnóstico para la tricomoniasis. Desde 2011, participa en el consorcio multidisciplinario formado por el Baylor College of Medicine, Texas Children Hospital Center for Vaccine Development, University of Tulane, Universidad Autónoma de Yucatán y Cinvestav para el desarrollo de la primera vacuna terapéutica contra la enfermedad de Chagas, iniciativa apoyada por la fundación Carlos Slim. El trabajo de su grupo ha generado >80 publicaciones científicas, >150 presentaciones en congresos nacionales e internacionales, tiene 4 patentes nacionales otorgadas y fue reconocido con el premio CANIFARMA-2012 en la categoría de desarrollo tecnológico. En su laboratorio han realizado su trabajo de tesis 11 doctores y 21 maestros en ciencias y >20 estudiantes de licenciatura han realizado estancias de investigación. El Dr. Ortega-López es miembro regular de la American Chemical Society, socio numerario de la Sociedad Mexicana de Bioquímica y de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. (SMBB). De esta última fue electo secretario de 1996-1998, vicepresidente 2018-2020 y presidente (2020-2022).



Chagasin as a molecular scaffold to express epitopes of TSA-1 antigen from *Trypanosoma cruzi*

The TSA-1 recombinant protein of *T. cruzi* is a promising antigen for developing a therapeutic vaccine against Chagas disease. However, it is efficiently expressed only in *Escherichia coli* as inclusion bodies requiring an additional refolding step. These limitations hinder the production of TSA-1 for clinical trials. As an alternative, in this study, we propose the endogenous cysteine protease inhibitor chagasin as a molecular scaffold to generate soluble chimeric proteins. These proteins will combine up to four of the five conserved epitopes (E1 to E5) of TSA-1 in the L2, L4, and L6 chagasin loops. Chimeras were designed, and their solubility was predicted using bioinformatics tools. This presentation will show the experimental results of nine of the twenty possible chimeras with two epitopes with different degrees of solubility that were selected and expressed in *E. coli* BL21 (DE3).



JORGE ALBERTO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ CIATEJ

Ingeniero Químico con maestría en Procesos Biotecnológicos por la Universidad de Guadalajara y con un doctorado en Ciencias en Química Orgánica de los Seres Vivos por la Universidad de Aix-Marseille II, Francia.

Cuenta con 15 años de experiencia como investigador, es coinventor de 5 patentes otorgadas, coautor de más de 70 artículos y capítulos de libro arbitrados, cuenta con dos premios estatales y un reconocimiento internacional como investigador. Actualmente adscrito como Investigador Titular C en el área de Biotecnología Industrial del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ) y es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) con la distinción como Investigador Nacional Nivel III desde el 2021.

Le apasionan los retos y realizar investigaciones que aporten al desarrollo científico y tecnológico para el beneficio de la sociedad cuidando el ecosistema.

Producción científica: <https://orcid.org/0000-0001-9544-2917>

Desarrolla métodos de cribado de alto rendimiento para la búsqueda de enzimas lipolíticas (lipasas/esterasas) de diferentes organismos (algunos de ambientes extremos) y estudios de mutagénesis dirigida para su relación estructura/función. El mayor impacto de sus investigaciones se ha reflejado en el sector agroindustrial mediante el cultivo de microorganismos por Fermentación en Medio Sólido (FMS) y la producción de enzimas nativas/recombinantes para la síntesis de moléculas bioactivas de aplicación en el sector salud y cosmético.



Efecto de la concentración sales en la actividad y estructura de lipasas/esterasas halófilas y halotolerantes

Los minerales en forma de sal tienen diversos efectos en las células y en sus componentes como las proteínas. Microorganismos halófilos y halotolerantes han adaptado mecanismos para poder funcionar a elevadas concentraciones de sal, donde algunas de sus proteínas y/o enzimas pueden llegar incluso a depender de las sales para su función óptima. Las lipasas/esterasas producidas por microorganismos, son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de ésteres solubles e insolubles (esto último solo lo pueden hacer las lipasas), siendo de los biocatalizadores más empleados en la síntesis orgánica de moléculas de interés industrial y biotecnológico. Entender la estructura/función de lipasas/esterasas halófilas y halotolerantes puede contribuir al diseño de nuevas enzimas con capacidades biocatalíticas mejoradas para ambientes menos favorables y por ende potencializar su aplicación en biocatálisis como el caso de la lipasa B de *Candida antarctica* (*Moesziomyces antarcticus*).

CÉSAR LUIS CUEVAS VELÁZQUEZ

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Es Ingeniero Bioquímico egresado con honores del Instituto Tecnológico de Zacatepec. Obtuvo su Doctorado en Ciencias Bioquímicas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Realizó su postdoctorado en el Departamento de Biología de la Universidad de Stanford. Durante su postdoctorado fue galardonado como PEW Latin American Fellow in the Biomedical Sciences. Desde 2019 es Investigador del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM.



Su desempeño fue reconocido al ser seleccionado para participar en la Reunión Lindau de laureados con el premio Nobel en 2017. Actualmente es miembro del SNI nivel 1. Ha publicado diversos trabajos en revistas indizadas, ha graduado 3 estudiantes de maestría y 5 estudiantes de licenciatura. Ha sido arbitro en revistas como Nature, PNAS, Cell Reports, Current Opinion in Plant Biology, entre otras.

Su laboratorio estudia la sensibilidad estructural de regiones intrínsecamente desordenadas en respuesta a cambios en las propiedades fisicoquímicas de células vivas.

Sensibilidad estructural al ambiente de proteínas intrínsecamente desordenadas

Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs, Intrinsically Disordered Proteins) son un tipo de proteínas que carecen de una estructura tridimensional bien definida. Debido a su naturaleza mayoritariamente desplegada, las IDPs están altamente expuestas al solvente. Como resultado, la conformación del ensamble de las IDPs es altamente sensible a cambios sutiles en la composición y las propiedades fisicoquímicas del entorno. Recientemente, hemos explotado una metodología para cuantificar la sensibilidad estructural al ambiente de las IDPs en un ambiente celular, usando FRET. Mediante el tamizaje de una biblioteca de 200 IDPs de todos los reinos de la vida, encontramos que las IDPs muestran diversos niveles de sensibilidad estructural en células vivas sometidas a choques hiperosmóticos. Estudios de asociación entre los niveles de sensibilidad y las propiedades codificadas en la secuencia de las IDPs nos han permitido encontrar que la distribución homogénea de aminoácidos con cargas opuestas a lo largo de la secuencia es necesaria para la sensibilidad estructural. Finalmente, nos encontramos diseñando, generando y caracterizando IDPs sintéticas con altos niveles de sensibilidad estructural. Los resultados obtenidos en este trabajo contribuirán a dilucidar la gramática molecular de la sensibilidad estructural de las IDPs en células vivas, un fenómeno con altas implicaciones en la percepción y respuesta de las proteínas ante cambios en su entorno.

Presentaciones orales

The Ribosome as a Selection Platform for Folded Proteins

José Arcadio Farías Rico

Abstract

Life on Earth owes its existence to proteins, the cellular nanomachines that adopt intricate 3D structures enabling them to carry out vital functions. The ribosome, responsible for synthesizing all proteins in the biosphere, plays a crucial role in cotranslational folding, where proteins begin to fold during the translation process. In this oral presentation, we delve into the influence of the ribosomal exit tunnel on the folded state of proteins.

To investigate this phenomenon, we employ cell-free protein expression systems together with arrest peptides. These short peptides effectively halt the ribosome during translation, allowing us to study the folding process and understand how different protein sequences are influenced by the ribosomal exit tunnel. Furthermore, we discuss the potential of using the ribosome as a selection platform for folded proteins. Additionally, we outline how our experimental setup could be leveraged to develop innovative biosensors based on the tension exerted by the polypeptide chain on the ribosome during translation.

By unraveling the intricate relationship between the ribosome and protein folding, we aim to shed light on fundamental aspects of cellular processes and potentially uncover new avenues for protein engineering and biosensor development.

References

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30224455/>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35707224/>

<https://www.fariaslab.org/>

UNA LECTINA MARINA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN, UN LEGADO DE LOS XIFOSÚRIDOS

Francisco Humberto Olvera Lucio¹, Héctor Riveros Rosas² y Alejandra Hernández Santoyo¹

¹Instituto de Química, UNAM, ²Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM, Ciudad de México, 04510, francisco.olveral93@gmail.com

Palabras clave: Lectina, repeticiones en tándem, *Limulus*

Introducción. *Limulus polyphemus* es un artrópodo marino considerado un “fósil vivo” del orden Xiphosurida [1]. Debido a las cinco extinciones masivas, los xifosúridos han quedado reducidos tan solo a cuatro especies. Éstas conservan las últimas proteínas de este legado, las cuales perderemos cuando ellos se extingan. Algunas de estas proteínas son lectinas con repeticiones en tándem que, hoy en día son herramientas importantes para el diseño de “neolectinas” con aplicaciones biomédicas y biotecnológicas [2].

Por este motivo, estudiamos bioquímicamente y estructuralmente a una lectina con repeticiones en tándem de *L. polyphemus*.

Metodología. Se identificó una lectina con repeticiones en tándem en el genoma de *L. polyphemus* y se expresó de forma recombinante en *E. coli*. Se purificó por afinidad a níquel a partir de cuerpos de inclusión. La actividad y plegamiento se evaluaron mediante ensayos de hemaglutinación y estudios de diámetro circular (DC) en la región UV lejana (190 – 260 nm) respectivamente. La estabilidad y especificidad se analizó mediante ensayos de termofluorescencia [3] y el comportamiento en solución por dispersión dinámica de la luz. Además, se evaluó su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. Finalmente, se recuperaron secuencias homólogas con las que se construyó un árbol filogenético y se analizó su distribución filética.

Resultados. La lectina recombinante de *L. polyphemus* (rLpL) tiene una masa de 13.1 kDa y un par de repeticiones en tándem (Fig. 1). Esta proteína se obtuvo con altos rendimientos (1 g/L de cultivo) siendo activa sobre eritrocitos de humano tipo A y estable en un intervalo amplio de pH. Los estudios de DC en la región del UV lejano mostraron que predominan hebras β en su estructura. La rLpL mostró especificidad hacia L-Fuc y GalNAc, azúcares terminales del antígeno humano tipo A. Se determinó que se encontraba monodispersa en solución, formando un oligómero de 24 subunidades (315 kDa). Además, la rLpL fue capaz de inhibir el creci-

miento tanto de bacterias gram positivas como negativas, entre ellas el patógeno marino *Vibrio parahaemolyticus*. Su distribución filética es amplia en bacterias, sin embargo, tan solo 3 especies de animales conservan a esta lectina.

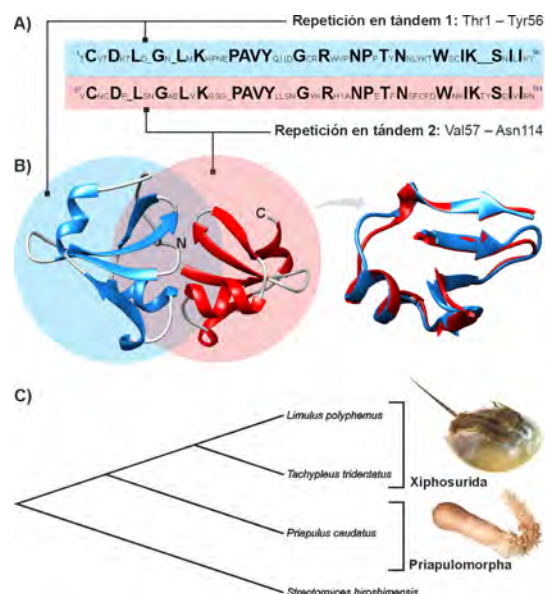


Fig. 1. A) Secuencia de la rLpL, las repeticiones en tándem se ilustran en diferente color. B) Modelo teórico de la estructura terciaria obtenida con el servidor Alpha-Fold y superposición de las repeticiones en tándem. C) Distribución filética de la rLpL en animales.

Conclusiones. Se obtuvo a la primera lectina recombinante con repeticiones en tándem de *L. polyphemus*, cuyo alto rendimiento, estabilidad y actividad antibacteriana son aspectos importantes para el diseño de lectinas en futuras aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Debido a la baja distribución filética en animales, podría considerarse como una lectina marina en peligro de extinción.

Agradecimiento. Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IN213022 y CONACyT por la beca doctoral CVU: 1102883.

Bibliografía. 1. Bicknell R.D.C. & Pates S. (2020) *Front. Earth Sci.*, 8(98).
2. Audfray A., et al. (2015) *PLoS ONE*, 10(6): e0128190.
3. Boivin, S., Kozak S. & Meijers R. (2013) *Protein Expr. Purif.*, 91(2): 192-206.

IDENTIFICATION OF LYSINE – LIKE LIGANDS FOR HUMAN ORNITHINE DECARBOXYLASE

Jessica Georgina Filisola Villaseñor¹, María Viridiana Olin Sandoval², Edgar Morales Ríos¹.

¹CINVESTAV Zacatenco, Departamento de Bioquímica, Ciudad de México, CP 07360.

²CINVESTAV Zacatenco, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Ciudad de México, CP 07360. edgar.morales@cinvestav.mx; viridiana.olin@cinvestav.mx

Keywords: cancer, human ornithine decarboxylase, thermostability assays.

Introduction. PAs synthesis is regulated by ornithine decarboxylase (ODC) ⁽¹⁾. There is a higher concentration of ODC in tumor cells, for what it has been considered as a therapeutic target ⁽¹⁾. ODC from *S. cerevisiae* and *R. norvegicus* is known to decarboxylate both Orn and Lysine (Lys) in a PLP dependent manner ^(2, 3). Previously, we performed a docking study assessing Lys-like molecules capable of interacting with HsODC and we explored the possibility of an allosteric site observed in the HsODC structure (PDB 2000) ⁽⁴⁾. In this project, we evaluated the interaction of these ligands obtained from docking by thermal shift assays (TSA), thus obtaining possible new inhibitors. Also, we have determined the capacity of the enzyme for decarboxylating Lys.

Methodology. For the activity assays we measured the consumption of protons by spectrophotometry using a pH indicator calculating the number of protons consumed during decarboxylation. And for the TSA analysis, we tested the best 30 compounds based in our docking analysis ⁽⁴⁾. TSA consists in measuring the increase in fluorescence by the binding of SYPRO Orange to the hydrophobic amino acid residues of the protein as it denatures by an increase of temperature. Adding a ligand to the protein will change the stability of the enzyme, requiring a higher/lower temperature for its denaturation ⁽⁵⁾. These measurements were performed in a Qiagen Rotor Gene Q real-time PCR equipment.

Results.

HsODC has also a lysine decarboxylase activity, having 50x more affinity for Orn than for Lys. TSA showed that the ΔT_m of HsODC with ligands B, C, D, E, F and G increased indicating that these compounds bind and stabilize the HsODC even more than its primary substrate Orn, and compounds T, AD and AF decreased the ΔT_m , destabilizing the enzyme (Fig. 1A). On the other hand, to evaluate the possible allosteric site we performed the TSA in the absence of PLP. In this case, the ligands that show a higher ΔT_m and stabilization capacity to the protein than Cad are W, I and AA and compounds G, A, R, Y, AC and AD have a lower ΔT_m (Fig. 1B). It is a matter of great

importance to evaluate the possible allosteric site, since we could find a novel acompetitive inhibitor that, alone or together with a competitive inhibitor, could improve the therapy of cancer.

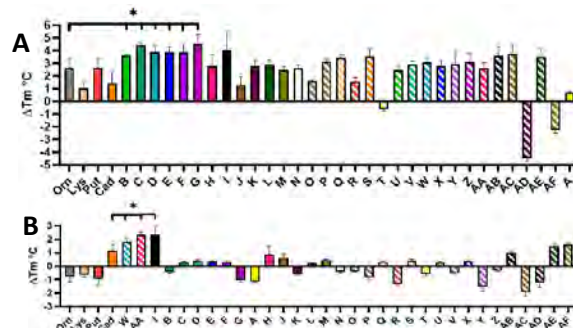


Fig. 1. HsODC TSA with ligands. Changes in melting temperature (ΔT_m) of HsODC in the catalytic (A) and possible allosteric site (B) with molecules selected by docking.

Conclusions. In this work we showed that HsODC is capable of decarboxylating Orn and Lys, with different affinities. Moreover, HsODC can bind Lys analogues in the allosteric and substrate binding sites, opening the possibility to find new HsODC inhibitors. Further inhibitions experiments are necessary to identify which of these molecules has the best activity.

Acknowledgement. The authors are gratefully for CONACYT. We thank Dra. Angélica Rueda and Dr. Jaime Ortega for helping us with the use of equipment and compounds for the TSA.

References.

- (1) Miller-Fleming L., Olin-Sandoval V., Campbell K. and Ralser M. (2015). *JMB*, 427, 3389–3406.
- (2) Olin-Sandoval V., Yu JSL., Miller-Fleming L., Alam M.T., Kamrad S., Correia-Melo C., Haas R., Segal J., Peña Navarro D.A., Herrera-Dominguez L., Méndez-Lucio O., Vowinkel J., Müller M. and Ralser M. (2019). *Nature*, 572(7768), 249-253.
- (3) Pegg AE. and McGill S. (1979). *Biochim Biophys Acta*, 568 (2): 416-27.
- (4) Filisola-Villaseñor JG., Olin-Sandoval M.V. and Morales-Ríos E. (2022). *In silico* study of new inhibitors of the human Ornithine decarboxylase. *Memorias. XXXIII National Meeting of Biochemistry*. Sociedad Mexicana de Bioquímica. Mérida, Yucatan, October 16-21, 1005.
- (5) Lucet IS. and Murphy JM. (2017). Characterization of Ligand Binding to Pseudokinases Using a Thermal Shift Assay. In: *Kinase Signaling Networks*. Tan AC., Huang P. Humana Press, USA. 91-104.

IMPLEMENTACIÓN Y MEJORA DE UN SISTEMA CRISPR-CAS PARA LA DETECCIÓN GENÉTICA DEL SARS-COV-2

Melissa Daniela Morales Moreno, Armando Hernández García
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México
Circuito interior S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán Ciudad de México Cp:04510,
mel.morales0797@gmail.com, armandohg@iquimica.unam.mx
Palabras clave: CRISPR-Cas, Detección, SARS-CoV-2

Introducción. La pandemia de COVID-19 ha tenido un gran impacto en México, siendo una de las principales causas de muerte. Aunque las vacunas han reducido las muertes, el virus sigue siendo una amenaza global y ha generado variantes. Se necesitan herramientas para el diagnóstico y tratamiento, y los sistemas CRISPR-Cas han mostrado su potencial en el desarrollo de métodos de diagnóstico¹. Un estudio utilizó la técnica de CRISPR-Cas12a combinada con RT-LAMP para desarrollar un método de diagnóstico genético para COVID-19². Mejoramos el método mediante ingeniería de gARN logrando una mayor sensibilidad y especificidad, reduciendo el tiempo de detección. Además, el método puede diferenciar las variantes del SARS-CoV-2. En la prueba de concepto, se detectaron con precisión muestras positivas y negativas utilizando una tira de flujo lateral portátil. El análisis se hizo en 25 minutos mediante mediciones de fluorescencia y observación visual³. Estos avances en el diagnóstico genético son importantes para controlar la enfermedad y detectar variantes de preocupación.

Metodología. Se diseñaron gRNAs y primers de LAMP para detectar el gen N del SARS-CoV-2. La reacción de RT-LAMP toma 15 minutos y la detección con CRISPR Cas tarda entre 25 y 45 minutos. La lectura de la señal se puede realizar mediante un lector de fluorescencia, tiras de flujo lateral o reacciones a simple vista. Para mejorar el sistema, se diseñaron múltiples gRNAs que reconocen diferentes sitios del mismo objetivo, y se probaron diversas combinaciones en una misma reacción.

Resultados.

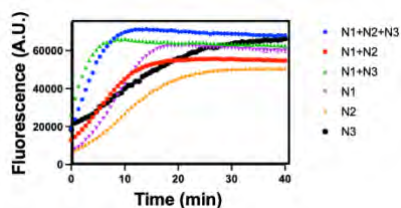


Fig. 1. Detección de amplicones RT-LAMP con CRISPR Cas12a utilizando diferentes combinaciones de ARNg mediante mediciones de fluorescencia. Se observa una mejora en la eficiencia cuando se combinan múltiples gRNAs.

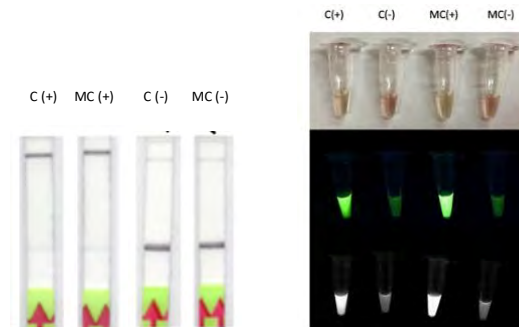


Fig. 2. Prueba de concepto con muestras clínicas. Ensayos en tiras de flujo lateral y pruebas a simple vista. El sistema detecta muestras clínicas de manera específica. C(+):Control positivo, C(-) Control negativo. MC (+) Muestra clínica positiva. MC(-) Muestra clínica negativa

Conclusiones. Implementamos y mejoramos un método CRISPR-Cas rápido, sensible y específico para detectar el gen N del SARS-CoV-2 que puede utilizarse en formatos portátiles. La combinación de varios gRNAs ayudó a acelerar y aumentar la sensibilidad de detección del gen diana en comparación con los gRNAs individuales. Además, el sistema se implementó para la diferenciación de la variante Omicron preocupante del SARS-CoV-2.

Agradecimiento. Apoyo financiero de la Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID) -Secretaría de Relaciones Exteriores de México (beca Proyectos COVID-19) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico- UNAM (beca PAPIIT IV200820).

Bibliografía.

- Hernandez-Garcia A, Morales-Moreno MD, Valdés-Galindo EG, Jimenez-Nieto EP, Quezada A. (2022) Diagnostics of COVID-19 Based on CRISPR-Cas Coupled to Isothermal Amplification: A Comparative Analysis and Update. *Diagnostics (Basel)*. 10;12(6):1434.
- Broughton, J.P., Deng, X., Yu, G. et al. (2020). CRISPR–Cas12a-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* 38, 870–874.
- Morales-Moreno MD, Valdés-Galindo EG, Reza MM, Fiordelisio T, Peon J, Hernandez-Garcia A. (2023) Multiplex gRNAs Synergically Enhance Detection of SARS-CoV-2 by CRISPR-Cas12a. *CRISPR J.* (2):116-126.

RrDapE COMO BLANCO DE NUEVOS TRATAMIENTOS CONTRA LA RICKETTSIOSIS

Jessica Guadalupe Pérez Payán, Manuel Terrazas López, Lilian González Segura, Ángel Gabriel Díaz Sánchez*. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Ciudad Juárez, C.P. 32310, al216746@alumnos.uacj.mx y angel.diaz@uacj.mx

Palabras clave: Rickettsia rickettsii, fármacos re-propósito, DapE

Introducción. *Rickettsia rickettsii* es una bacteria parasitaria intracelular obligada, causante de la fiebre manchada de las montañas rocosas (FMRR). Este patógeno sintetiza componentes esenciales para su pared celular por medio de la ruta del meso-diaminopimelato, siendo la N-Succinil-L,L-diaminopimelato desuccinilasa (DapE) una de las enzimas de esta ruta aún no explorada farmacológicamente¹, la cual se ha empleado como blanco farmacológico efectivo en otros patógenos². DapE es una metalo-amidohidrolasa dimérica estricta. El sitio activo de la enzima se ensambla después de un ajuste inducido por la unión del sustrato e involucra a los centros metálicos y residuos de la intercara dimérica. Algunas de las características de su sitio activo, reveladas por medio de aspectos estructurales, se han explotado para la identificación de los grupos funcionales que deben poseer los agentes anti-DapE ideales y específicos. En el presente proyecto se investigan los posibles inhibidores de la DapE de *Rickettsia rickettsii* (RrDapE) con el objetivo de que potencialmente, puedan utilizarse a futuro como medicamentos con re-propósito contra la FMRR.

Metodología. Se modeló la enzima RrDapE por Ab Initio a partir de la secuencia depositada en UniProt (Q9ZC93 · DAPE_RICPR). Este modelo se cargó en la plataforma ZINCPharmer, seleccionando su sitio activo como blanco para unión a fármacos. Los 500 resultados originales se revisaron manualmente, eliminando aquellos que no cumplían con los criterios de inclusión³, obteniendo al final cuatro candidatos con potencial inhibidor. Se obtuvo la RrDapE de forma recombinante, clonando RrDapE en *E.coli* BL21_pET16b. La sobre-expresión y purificación se realizó siguiendo protocolos para enzimas DapE de otras especies². Se realizaron ensayos de unión al equilibrio (monitoreo de cambios en la fluorescencia intrínseca λ_{ex} 290 nm- λ_{em} 340 nm) entre RrDapE (0.05 mg/mL) y concentraciones variables de cada fármaco. Posteriormente se realizaron estudios de inhibición utilizando *p*-Nitrofenil acetato como sustrato análogo (100 μ M), monitoreando el decremento en la formación de *p*-nitrofenol (403 nm) por influencia de varias concentraciones de los fármacos.

Resultados. Los cuatro candidatos con potencial inhibidor contra RrDapE fueron: Quercetina, Tigeciclina, Ertapenem y Penicilina G.

Tabla 1. Uniones al equilibrio entre cuatro fármacos y RrDapE.

| Fármaco | B_{max} (Δ IF UA) | K_d (μ M) |
|--------------|-----------------------------|---|
| Quercetina | 3392.00 \pm 355.30 | 30.05 \pm 9.05 |
| Tigeciclina | 2693.00 \pm 89.25 | 34.70 \pm 3.02 |
| Ertapenem | 2980.00 \pm 367.20 | 610.00 \pm 190.00 |
| Penicilina G | 1587.00 \pm 5863.00 | 29.05x10 ³ \pm 104.50 x10 ³ |

Tabla 2. Inhibición de la actividad catalítica de RrDapE en presencia de fármacos

| Fármaco | %Inhibición | I_{50} (μ M) |
|--------------|-------------|---------------------|
| Quercetina | 14.567 | 17.51 \pm 2.86 |
| Tigeciclina | 26.936 | 0.61 \pm 0.11 |
| Ertapenem | 57.939 | 24.02 \pm 4.27 |
| Penicilina G | 20.257 | 429.10 \pm 38.2 |

Conclusiones. Penicilina G se ha descartado como potencial blanco contra RrDapE, sin embargo, tigeciclina (tetraciclina) se propone como potencial tratamiento contra la rickettsiosis debido a sus bajos I_{50} y K_d . Quercetina también se propone como un tratamiento alternativo o conjunto, comportándose de forma similar a lo descrito previamente para otras especies². Pese a que ertapenem presenta un I_{50} bajo, su poca afinidad por la enzima sugiere que no es una alternativa viable como tratamiento.

Agradecimiento. Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar este proyecto.

Bibliografía.

1. Driscoll, T. P.; Verhoeve, V. I.; Guillotte, M. L.; Lehman, S. S.; Rennoll, S. A.; Beier-Sexton, M.; Rahman, M. S.; Azad, A. F.; Gillespie, J. J. (2017). *MBio*. 8(5): 1-27.
2. Terrazas-López, M.; Lobo-Galo, N.; Aguirre-Reyes, L. G.; Cuen-Andrade, J. L.; de la Rosa, L. A.; Alvarez-Parrilla, E.; Martínez-Martínez, A.; Díaz-Sánchez, Á. G. (2020). *Biochimie*. 177: 198-212.
3. Lobo-Galo, N.; Terrazas-López, M.; Díaz-Sánchez, Á.; Martínez-Martínez, A. (2021). *J. Biomol. Struct. Dyn.* 39(9): 3419-3427.

Análisis *in silico* de TBP1 y TBP2 de *Taenia solium*: factores estructurales relacionados al reconocimiento y selectividad de caja TATA.

Oscar Rodríguez-Lima¹, Juan Rodrigo Salazar², María Fernanda Pérez-Téllez², Alonso Mendez-Perez², Lucía Jiménez¹, Ricardo Miranda-Blancas¹, Marco A. Loza-Mejía², Abraham Landa¹.

¹Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad de México, 04510. ²Grupo de Investigación en Diseño, Aislamiento y Síntesis de Moléculas Bioactivas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad La Salle. Ciudad de México, 06140.

orodriguez@facmed.unam.mx

Palabras clave: factor de transcripción, TBP, *Taenia solium*.

Introducción. TBP1 y TBP2 son dos isoformas de la Proteína de unión a caja TATA (TBP), de gran importancia en la regulación transcripcional en eucariotas. La caja TATA (TATA), es un elemento de DNA localizado río arriba del sitio de inicio de transcripción. TBP1 y TBP2 son codificados por diferentes genes y comparten un alto grado de similitud. Sin embargo, tienen diferentes funciones y patrones de expresión. TBP1 se expresa ubicuamente y está involucrado en la transcripción de genes que codifican para proteínas; mientras que TBP2 se expresa principalmente en células germinales y es importante en la regulación de la espermatogénesis (1). En *Taenia solium* se han identificado ambas TBP's (TsTBP), pero poco se sabe sobre su función (2,3). En este trabajo clonamos y caracterizamos el gen que codifica para TsTBP1 y TsTBP2. Analizamos su estructura y generamos modelos tridimensionales, finalmente, mediante docking y dinámica molecular identificamos su interacción con diferentes TATAs.

Metodología. Mediante técnicas de biología molecular identificamos, clonamos y secuenciamos el DNAg y DNac que codifica para TsTBP1 y TsTBP2 (2). Determinamos su expresión diferencial mediante qPCR. Generamos su estructura tridimensional mediante modelado por homología con Yasara Structure y la calidad de dichos modelos fue verificada con SAVES, ERRAT y PROCHECK (4). Posteriormente hicimos un docking DNA-TF inicial con HDOCK (5) y posteriormente con Yasara Structure usando AMBER14 force field.

Resultados. Identificamos la secuencia codificante para las TsTBP1 y TsTBP2, mostrando proteínas de 238 aa con un peso de 26.7 kDa; y de 215 aa con un peso de 24.2 kDa, respectivamente. Se observó una expresión diferencial de ambos genes en su estadio larvario y de adulto mediante qPCR. Los modelos tridimensionales generados por homología tienen la estructura clásica de las TBPs. Asimismo, el análisis de la isosuperficie arroja una carga predominantemente positiva en su dominio de interacción con el DNA (Fig. 1). Por otro lado, se observó una interacción diferencial con diferentes TATA, teniendo una

mayor afinidad a TATA del propio parásito, cuando es comparada con TATA consenso de mamífero como control.

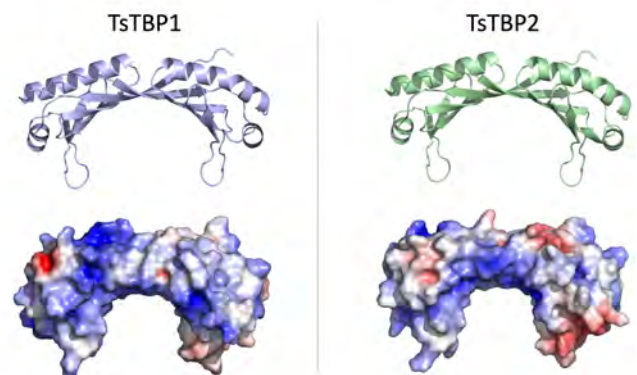


Fig.1. Estructura 3D de TsTBP1 y TsTBP2 obtenido por homología. Representación de listones (arriba) e isosuperficie (abajo).

Conclusiones. *T. solium* posee dos TBPs codificadas por diferentes genes, y con una expresión diferencial en estadio adulto y larvario. La estructura 3D de ambas mantienen la clásica forma de moño y la interacción con diferentes TATA. Teniendo una mayor afinidad a genes con TATA del propio parásito comparada con los controles de mamífero.

Agradecimiento. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-176925), Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPAPAPIIT-IN205422), y Miztli de la Dirección de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (LANCAD-UNAM-DGTIC-344).

Bibliografía.

- Mishal R, Luna-Arias JP. Gene. 2022 Jul 30;833:146581.
- Rodríguez-Lima O, García-Gutiérrez P, Jiménez L, Zarain-Herzberg Á, Lazzarini R, Landa A. PLoS One. 2015 Nov 3;10(11):e0141818.
- Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, et al. Nature. 2013 Apr 4;496(7443):57-63.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. (1993). J. Appl. Cryst. 26, 283-291.
- Yan Y, Tao H, He J, Huang SY. Nat Protoc. 2020 May;15(5):1829-1852.

PLASTICIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL CLUSTER [4Fe-4S] EN LA ENZIMA DE REPARACIÓN DEL ADN MUTY; DE CARCINOGENESIS A SOLUCIONES EVOLUTIVAS ALTERNATIVAS.

Carlos H. Trasviña-Arenas¹, Martin Horvath³, Andrew Fisher², Sheila S. David².

¹ Centro de Investigación sobre Envejecimiento, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México, 14330, México.

² Department of Chemistry, University of California, Davis, California, 95616, United States

³ School of Biological Sciences, University of Utah, 257 S 1400 E, Salt Lake City, Utah, 84112

carlos.trasvina@cinvestav.mx, ssdavid@ucdavis.edu

Palabras clave: Reparación del ADN; MutY; [4Fe-4S] cluster.

Introducción. MutY, es una ADN glucosilasas (DG) que participa en la reparación de malos apareamientos derivados de la oxidación de la guanina a 8-oxoguanina (OG), particularmente A:OG. También es una de las pocas metalo-DG que coordina un clúster [4Fe-4S] que esta implicado a diversos aspectos funcionales de MutY; desde localización de lesiones en el genoma, hasta plegado correcto de la proteína¹. También la importancia de este cofactor está dada por mutaciones dentro del dominio del clúster [4Fe-4S] en el homólogo humano MUTYH que han sido asociados a carcinogénesis². No obstante, a pesar de ser considerado un cofactor irremplazable, se han reportado homólogos de MutY funcionales que carecen del clúster [4Fe-4S]¹.

Este trabajo tiene como objetivo entender el funcionamiento de MutY/MUTYH en dos rublos 1) entender las implicaciones estructurales de la mutación R241Q dentro del dominio de clúster [4Fe-4S] en el homólogo humano MUTYH y su implicación en cáncer; y 2) Dar explicación de las determinantes evolutivas-estructurales de las soluciones alternativas en homólogos de MutY que carecen del cofactor.

Metodología. Para entender las implicaciones de la mutante R241Q en MUTYH se cristalizó y resolvió la primera estructura reportada del homólogo humano WT y su correspondiente mutación en el homólogo de *Geobacillus stearothermophilus*.(Gs). Así mismo, se cristalizó y resolvió la estructura de la MutY de *Eggerthella sp.* que carece del clúster [4Fe-4S]. Las deducciones estructurales fueron sustentadas por estudios de cinética enzimática, ensayos EMSA y ICP-MS para análisis de metales.

Resultados. Ensayos de actividad enzimática demostraron que la mutante R241Q asociada a cáncer en MUTYH carece completamente de actividad de reparación del ADN, sin perder su habilidad de unirse al ADN. La estructura de MUTYH WT demostró que R241 es un elemento importante para mantener una conectividad estructural entre el clúster [4Fe-4S] y el sitio catalítico. La mutación R241Q desconecta dicha comunicación que conlleva a un desfase en la protonación del residuo catalítico D236, afectando así la

catálisis. Por otro lado, la estructura resuelta de la MutY de *Eggerthella sp.*, además de carecer del clúster [4Fe-4S] mostró divergencias mayores en otros dominios canónicos de MutY, por lo que se decidió nombrar esta MutY novedosa 'MutYX'. Dentro de las dos diferencias más importantes en MutYX están la adquisición de una nueva esfera de reconocimiento de OG, y una estabilización de la α -hélice H9 mediante la expansión de la α -hélice H11 y la adquisición de una nueva α -hélice (Hw), que juntas estabilizan la α -hélice H9 necesaria para mantener la estabilidad estructural del sitio activo de MutYX ante la carencia del cofactor.

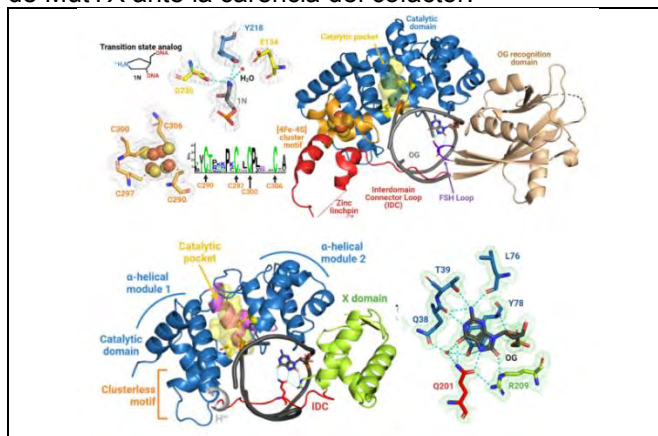


Fig. 1 Arriba se muestra la estructura de MUTYH destacando el sitio activo y la coordinación del clúster [4Fe-4S]. Abajo, la estructura de MutYX acompañada con la nueva esfera de reconocimiento de OG.

Conclusiones. En este trabajo se descubrió un nuevo rol del clúster [4Fe-4S] en MutY. Fungiendo como un modulador estructural del sitio activo. Por otro lado, demostramos que en homólogos que carecen del cofactor, evolutivamente, tuvieron que desarrollar formas alternas para estabilizar la conectividad y modulación del sitio activo.

Bibliografía

1Al-Tassan, Nada, et al. "Inherited variants of MYH associated with somatic G: C→ T: A mutations in colorectal tumors." *Nature genetics* 30.2 (2002): 227-232.

2 Trasvina-Arenas, C. H., et al. "Structure, function and evolution of the Helix-hairpin-Helix DNA glycosylase superfamily: Piecing together the evolutionary puzzle of DNA base damage repair mechanisms." *DNA repair* 108 (2021): 103231.

EXPLORANDO LA DINÁMICA CONFORMACIONAL DEL MOTIVO RHIM EN LA
FORMACIÓN DE AMILOIDES

Gustavo Titau, Paula Polonio y Miguel Mompeán.

Instituto de Química Física Blas Cabrera CSIC, departamento de estructura, dinámica e interacciones de proteínas por RMN. Madrid 28006, gtitau@iqfr.csic.es

Palabras clave: RMN, región RHIM, amiloides

Introducción. El RHIM (RIP homotypic interaction motif) es un motivo esencial en la señalización de respuestas inmunitarias específicas, activación de factores de transcripción y ciertas vías de muerte celular¹. La señalización RHIM ocurre después de la formación de amiloides funcionales, y aunque la biología estructural de estos complejos RHIM de orden superior ha comenzado a emerger, las conformaciones y dinámicas de los RHIM no ensamblados aún son desconocidas. El RHIM de RIPK3 (Receptor interacting serine/threonine kinase 3), reportado en 2002, es una secuencia hidrofóbica que consta de 16 residuos (448-464) y es clave para regular las interacciones homotípicas y heterotípicas de este tipo de proteínas^{2,3}. En este estudio, utilizamos resonancia magnética nuclear (RMN) en solución para caracterizar la forma no ensamblada del dominio C-terminal (387-518) de la proteína RIPK3.

Metodología. RIPK3₍₃₈₇₋₅₁₈₎ fue producida como una proteína de fusión (His)₆-ubiquitina-RIPK3 con un sitio de corte TEV entre la ubiquitina y RIPK3₍₃₈₇₋₅₁₈₎. La proteína se etiquetó uniformemente con ¹³C y ¹⁵N expresada en *E.coli* (BL21). La caracterización espectroscópica se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker Avance Neo 800 MHz equipado con una criosonda TCI. Para la asignación de la cadena principal se utilizaron los experimentos 3D H(NCOCA)HN, HNCO, HNCACO, (H)N(COCA)NH, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB. Para la cadena lateral (H)CC(CO)NH y para las dinámicas se midieron las tasas de relajación R₁, R₂ y R_{1ρ}.

Resultados. Ripk3₍₃₈₇₋₅₁₈₎ presenta características de proteína intrínsecamente desestructurada corroborado por los desplazamientos químicos (CA, CB, CO, N y HN) así como por las constantes de acoplamiento (³J_{HNHA}). Analizando los espectros de RMN en condiciones de ensamblaje y no ensamblaje se pueden observar las regiones más flexibles de los ensamblados. La dinámica reveló una zona previa al RHIM de interacción nunca antes vista en las fibras amiloides.

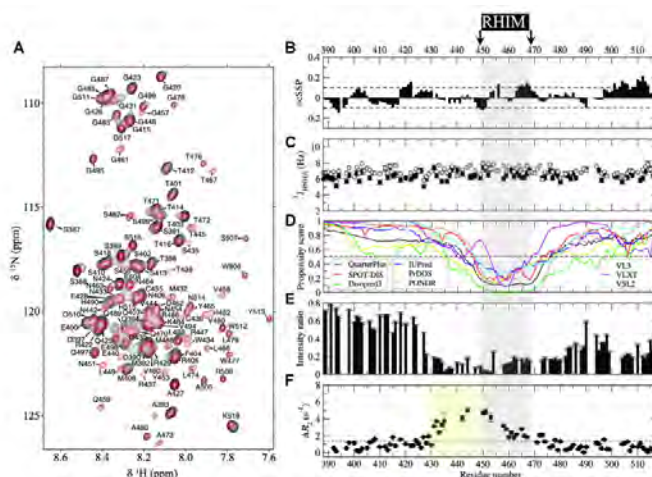


Fig. 1. Caracterización por RMN de RIPK3₍₃₈₇₋₅₁₈₎. A, espectro ¹H-¹⁵N HSQC en rojo 18 uM (no ensamblaje) en negro 180 uM (condiciones ensamblaje). B, propensión de estructura secundaria. C, constantes de acoplamiento ³J_{HNHA} experimentales (negras) y predichas (gris). D, predicciones de estructura secundaria. E, relación de intensidades entre 180 uM (condiciones ensamblaje) y 18 uM (no ensamblaje). F, Diferencias entre las tasas de relajación R₂ en condiciones de ensamblaje y no ensamblaje.

Conclusiones. En contraste con las predicciones, la región RHIM de RIPK3 es un motivo intrínsecamente desordenado. Su dinámica de intercambio entre monómeros libres y monómeros unidos a amiloides involucra una región de 20 residuos fuera del RHIM nunca antes observado en fibras amiloides de RIPK3 determinadas por criomicroscopía electrónica o RMN de estado sólido.

Agradecimiento. Este trabajo fue apoyado por el programa FJC2021-047976-I financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por European Union Next Generation EU/PRTR. Cofinanciamiento por la Unión Europea (ERC, 101042403 - BiFOLDOME).

Bibliografía.

1. Wu, X., Ma, Y., Zhao, K., Zhang, J., Sun, Y., Li, Y., et al. (2021). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118. e202293311
2. Sun, X., Yin, J., Starovasnik, M. A., Fairbrother, W. J., and Dixit, V. M. (2002). *J. Biol. Chem.* 277, 9505–9511.
3. Mompeán, M., Li, W., Li, J., Laage, S., Siemer, A. B., Bozkurt, G., et al. (2018). *Cell* 173, 1244–1253

MOLECULAR BASIS OF STUDY OF NEW ANTIBIOTICS TO FIGHT ANTIBIOTIC RESISTANCE

Siseth Martínez-Caballero, Departamento de Química de Biomacromoléculas, UNAM. Ciudad Universitaria, CDMX, C.P. 04510. siseth.martinez@quimica.unam.mx

Palabras clave: antibiotic resistance, peptidoglycan, bacteria

Introduction. The peptidoglycan (PG) is a critical cell wall component, and its principal function is contributed to resist the intracellular osmotic pressure. Also, the PG defines bacterial cell shape and provides an important role in the grown cell, cell-cell communication, and the beginning immune response. Besides of its essential role in the bacteria, this macromolecule is a component unique in these organisms therefore all the proteins involved in cell wall synthesis and remodeling processes are key targets for new drugs.

The aim of this work was the identification and structural study of two new targets: PBP2a_{Sa} from Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) and Ami1_{Mtb} from *M. tuberculosis* participant in the synthesis and recycling of PG respectively.

Methodology. Using techniques of molecular biology, we express and purify both recombinant proteins: PBP2a_{Sa} and Ami1_{Mtb}. We resolved the 3-D structures using X-ray crystallography and in combination with microbiological studies, biophysical characterization, and virtual screening we have proposed novel targets and new molecules to the design and/or use combined of antibiotics.

Results. PBP2a from MRSA: β -lactam antibiotics block the synthesis of the bacterial cell wall through inhibition of the transpeptidase activity of Penicillin-Binding Proteins (PBPs). A major β -lactam resistance determinant of MRSA is the *mecA* gene, encoding PBP2a¹. In this work, we have proposed the mechanism of action of a triple combination of a quinazolinone allosteric inhibitor and piperacillin-tazobactam (TZP) (Fig. 1). We demonstrated the efficacy of the triple drug combination *in vivo* and *in vitro* also the crystal structure for complexes of antibiotics with PBP2a provide support for the proposed mechanism.²

Ami1 from *M. tuberculosis*: Amidases remove the entire peptide stem from the glycan strands. Therefore, these proteins participate in the hydrolysis and recycling of PG. In *M. smegmatis* the deletion of *ami1* leads to increased cell wall permeability and enhanced susceptibility to cell wall targeting antibiotics³. So, in this work we generated a data base by virtual screening of candidate molecules for the inhibition of Ami1_{Mtb}.

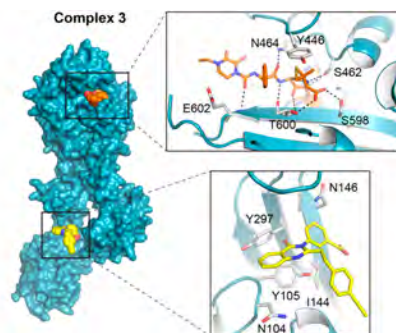


Fig. 1. 3-D structure of the ternary complex PBP2a_{Sa}-quinazolinone-piperacillin (PIP). Shown is the molecular surface of complex, with quinazolinone and PIP in spheres (yellow and orange respectively). Right, detailed view of residues interacting with ligands and active sites.

For some of these molecules, we also report a thermal-shift assay screening approach that can led the discovery of possible Ami1_{Mtb} inhibitors (Fig. 2).

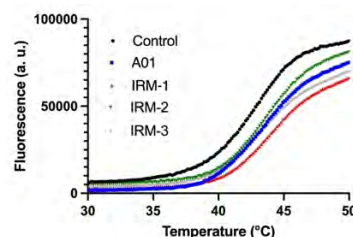


Fig. 2. Melting curves of Ami1_{Mtb} in the presence of compound A01 (20 μ M), IRM-1 (10 μ M), IRM-2 (10 μ M) and IRM-3 (20 μ M) as compared with the protein incubated with 2% DMSO.

Conclusions. Our results provide new insights into the inhibition of PBP2a_{Sa} and pave the way for the development of new compounds to Ami1_{Mtb}.

Acknowledgments. The PBP2a work was supported by grant BFU2017-900030-P from the Spanish Ministry of Science and the Ami1_{Mtb} work was supported by grant CONAHCYT 319596 and PAPIIT IA205122.

References.

1. Katayama Y, Ito T, Hiramoto K. (2000) *Antimicrob Agents Chemother.* 44:1549 – 1555.
2. Janardhanan J, Bouley R, Martínez-Caballero S, et al. (2019) *Antimicrob Agents Chemother.* Vol 63(5), e02637-18.
3. Senzani S, Li D, Bhaskar A. (2017) *Sci Rep.* 7:1140.

IDENTIFICATION OF INTERMEDIATES IN THE AGGREGATION PATHWAY OF IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAINS

Yadira Meunier-Carmenate, Roberto Maya-Martinez, Leidys French-Pacheco, Arline Fernández-Silva, Yoselin González-Onofre, Carlos Amero.

Laboratorio de Bioquímica y Resonancia Magnética Nuclear, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62200. carlosamero@uaem.mx

Keywords: AL amyloidosis; nuclear magnetic resonance; dynamic light scattering

Introduction. Proteins are essential biomolecules that perform a wide range of functions in living organisms. To function properly, they usually need to fold into well-defined three-dimensional structures. Under certain circumstances, some proteins misfold and form amyloid fibers. The mechanisms that lead to the formation of these aggregates from folded proteins are not clear, but for several systems the existence of partially folded intermediate states that facilitate the association of units has been proposed.

Here, we present a biophysical characterization of the unfolding-aggregation mechanism, describing different transient intermediates, for the 6aJL2 protein under temperature, a destabilized mutation, and pH¹.

Methods. We evaluated the unfolding and aggregation process by a combination of time-dependent methods, such as dynamic light scattering (DLS), fluorescence spectroscopy, and nuclear magnetic resonance (NMR).

Results. With the information provided by each of the techniques used, we found that the 6aJL2 protein at 37°C pH 7 forms a transient oligomeric intermediate before aggregating without a transition through an unfolded state. While the R24G mutation and pH 2 destabilize the protein, inducing partially unfolded intermediates, which promotes the formation of aggregates.

Here, we describe the first steps in the formation of amyloid fibrils as a detailed molecular pathway that is consistent with the available data.

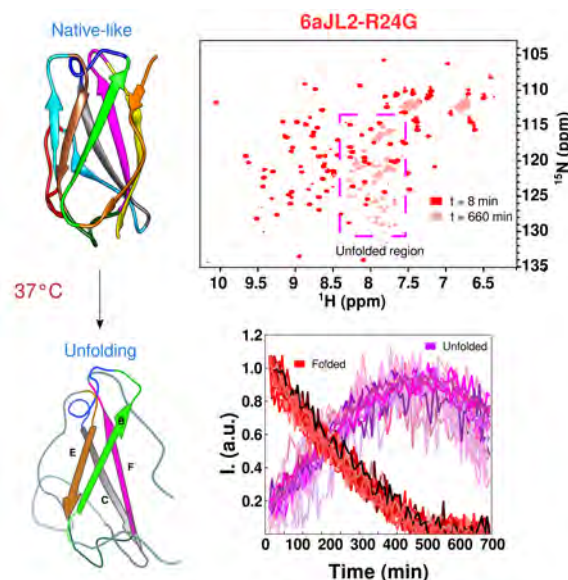


Fig. 1. Two time points in a series of two-dimensional HSQC spectra at 37 °C. The appearance of new cross-peaks in the unfolded region over time was detected. The intensities of the signals as a function of time describe the behavior of the population of each conformation.

Conclusions. Our results suggest that the difference in amyloidogenicity is caused by the population of different intermediaries and by the efficiency in the population of them.

Acknowledgements. This research was funded by LabDP and CONACYT A1-S-11842. The authors acknowledge the LANEM-2013 for NMR instrumentation.

References.

Meunier-Carmenate Y., Valdés-García G., Maya-Martinez R., French-Pacheco L., Fernández-Silva A., González-Onofre Y., Millan-Pacheco C., Pastor N., Amero C., (2023) *Biochemistry* 2023, 62, 5, 1000–1011



DISEÑO DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA A TRAVÉS DE HERRAMIENTAS DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL

Alejandro Sosa-Peinado^{1,2}, Renan Vergara², Alfredo Quijano-Rubio² y Daniel A. Manzano-Silva²,
¹Departamento de Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM, CDMX 04510, asosa@bq.unam.mx. ²Monod
 Bio.Inc. Seattle, WA 98109.

Palabras clave: Diseño de Proteínas, AlphaFold, Paisaje de Energía.

Introducción. El rediseño de proteínas cumple más de 30 años desde los trabajos pioneros de William DeGrado (1990) durante el diseño de un ensamble de helices anfipáticas. En el 2003 el grupo de David Baker diseñó la primera proteína *de novo*: “Top7”, a partir de la búsqueda de mínimos energéticos que permiten obtener la secuencia de aminoácidos que se ajusta a una estructura deseada.

La suite computacional con la que se diseñó Top7 es el programa llamado “Rosetta”, el cual ha estado en constante evolución para incorporar las búsquedas de estructuras con mínimos energéticos en las que las proteínas se pliegan.

En este sentido la suite denominada AlphaFold2 adicionó las herramientas de la inteligencia artificial para encontrar la conformación estructural de una proteína asociada a una secuencia de aminoácidos a niveles del $\geq 96\%$ de precisión.

Es decir el problema del rediseño de proteínas, está fuertemente asociado a las técnicas que permiten moverse en el paisaje energético que presenta una proteína. En este trabajo mostramos cómo utilizar estas técnicas para diseñar interacciones proteína-proteína con proteínas *de novo*.

Metodología. Se utilizó un cluster basado en GPU's, en donde se instaló AlphaFold2 versión 2.2.4(1). El cluster contiene las librerías de datos metagenómicos que permiten hacer el alineamiento múltiple (MSA), acorde a los programas Hhblits(2), JackHMMER(3). Cuando se utilizaron *proteínas de novo*, se corrió AlphaFold sin alineamiento múltiple.

Resultados.

La búsqueda de una estructura con la suite AlphaFold2(1) permite una precisión estructural del 96%(1), con RMSD menores a 1Å de la estructura original. Sin embargo el potencial de uso de esta tecnología es más para rediseñar proteínas que sean capaces de interactuar con un ligando u otra proteína (por ejemplo anticuerpos *de novo*), y/o predefinir un cambio conformacional (alosterismo).

A continuación se describe la ruta para obtener dos proteínas *de novo*: a) una al antígeno prostático, b) la proteína que reconoce a Tau fosforilada. Ambas proteínas serán utilizadas como las proteínas de

reconocimiento de un biosensor *de novo* diseñado en el laboratorio (4).

Para ello generamos la siguiente estrategia de trabajo:
 1-Se generaron por AF2 un fragmento de anticuerpo con el sitio de reconocimiento al epítopo.

2-Comparamos el RMSD la estructura cristalográfica original de la estructura con la estructura diseñada como guía..

3- Se delimitó el sitio de unión (regiones CDR) para dejar fijos esos residuos en la búsqueda. Se permitió que la proteína cambie de secuencia de aminoácidos en el esqueleto hidrocarbonado del resto, a través de la metodología de MPNN, ya que la búsqueda del espacio de secuencia permite hacer una búsqueda más extensiva.

4-La estructura que se varió computacionalmente a partir de la secuencia se sometió a AF2, se queda fija y se permite variar el sitio de unión.

5-Las secuencias de los mejores resultados (pIDDT) se mandan sintetizar y subclonaron en un vector de expresión, se determinó su unión a través de la técnica de resonancia de plasmones.

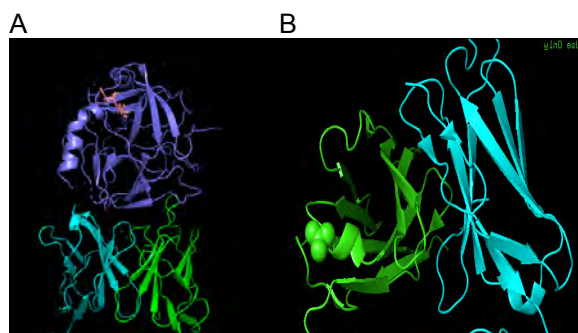


Fig. 1. Estructuras de proteínas diseñadas *de novo* con capacidad de interactuar con A. proteína reactiva al antígeno prostático y B) proteínas Tau fosforilada

Conclusiones. Se obtuvo una eficiencia del 30% en proteínas que unen a la proteína de interés.

Bibliografía.

1. Jumper, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. (2021) *Nature* 596, 583–589.
2. Yang, J., Anishchenko, I., Park, H., Peng, Z., Ovchinnikov, S., Baker, D. (2020). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 1496–1503.
3. Remmert, M.; Biegert, A.; Hauser, A.; Söding, J. Hhblits: (2012). *Nat. Methods*, 9, 173–175
4. Quijano-Rubio A. y col (2021). *Nature*. 59. 482-487.

METALS AND CATARACTS: DISECTING THE MOLECULAR MECHANISMS OF METAL INDUCED AGGREGATION OF BETAB2-CRYSTALLIN.

Martin E. Tovar-Ramírez,¹ Nils Schuth¹, Oscar Rodríguez-Meza,² Thomas Kroll³, Gloria Saab-Rincon,⁴ Miguel Costas,² Kirsten Lampi,⁵ Liliana Quintanar^{1,7} lilianaq@cinvestav.mx ¹Department of Chemistry, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Mexico City, 07360, Mexico. ²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, 04510, Mexico. ³Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL), SLAC National Accelerator Laboratory, Menlo Park, 94025, CA, USA. ⁴Department of Biocatalysis and Cellular Engineering, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, 62210, Mexico. ⁵Integrative Biosciences, Oregon Health & Science University, Portland, Oregon, 97239, United States.

Keywords: Metal ions, metal-induced aggregation, beta-crystallins, copper, cataract disease.

Introduction. Cataracts disease is one of the principal causes of visual impairment in the world. The etiology of the disease involves damage, unfolding and subsequent non-amyloid aggregation of crystallins, highly soluble lens proteins responsible for the transparency of the eye lens.¹ Recent studies have demonstrated that some metal ions, such as copper, zinc and mercury can induce the aggregation of human γ -crystallins through various mechanisms.² In this work we present the bioinorganic chemistry behind the molecular mechanism of metal-induced aggregation of β B2-crystallin. The most abundant β -crystallin in the eye lens.

Methods. Purification of the recombinant proteins produced in *E. coli* was made using IMAC and then IEX chromatography. The peptide model was prepared by solid phase synthesis and purified by reverse phase HPLC. Metal-induced aggregation was measured by optic dispersion at 400 nm and SDS-PAGE. For the case of copper, the copper-protein interaction was evaluated by different spectroscopic and analytic techniques such as circular dichroism (CD), electron paramagnetic resonance (EPR), X-ray absorption spectroscopy (XAS) and isothermal titration calorimetry (ITC).

Results. The metals Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} can induce the aggregation of this protein and EDTA can revert it partially (fig 1A&B). For copper, the SDS-PAGE analysis of the metal-induced protein aggregates reveal the presence of disulfide-bridged species. Spectroscopic studies of the Cu^{2+} - β B2-crystallin interaction by EPR (fig 1E), CD and XAS shows the presence of at least three metal binding sites in the protein. Surprisingly, one of them resembles that of Cu^{2+} bound to an amino-terminal copper and nickel binding motif (ATCUN), which is found in proteins and peptides that bind copper with high affinity and are involved in copper cellular trafficking. This ATCUN-like motif has a surprisingly high affinity for copper as revealed by ITC. On the other hand, Cu-induced

formation of sulfur oxidized oligomers of β B2-crystallin and an unexpected decreased EPR signal intensity suggests reduction of copper to Cu^+ , as confirmed by XAS (fig E&D).³

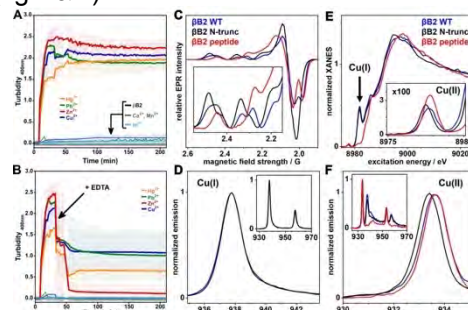


Fig. 1. Metal-induced aggregation of β B2-crystallin (A&B). EPR (C) and XAS spectroscopic (D-F) comparison of β B2-crystallin, N-truncated protein and the β B2(1-6) peptide.

Conclusions. Our results suggest that metal-induced aggregation of β B2-crystallin can involve several mechanisms, for copper and zinc include the formation of metal-bridged species and specifically for copper the formation of disulfide-bridged species, and a very interesting copper-dependent redox process.

Acknowledgments. Thanks to CONACYT (PN2076). M.T-R thanks to CONACYT for the PhD scholarship (892107).

References. [1] A) Sharma, K. K., Santhoshkumar, P., (2009), *Biochim. Biophys. Acta*, 179, 1095-1108. B) Moreau, K. L., King, J. A., (2012), *Trends Mol. Med.*, 18, 273-282. C) Bassnet, S., Shi, Y., Vrensen, G. F. (2011), *J. M. Phil. Trans. R. Soc. B*, 366,1250-1264. [2] A) Quintanar, L., Dominguez-Calva, J. A., Serebryany, E., Rivillas-Acevedo, L., Haase-Pettingell, C., Amero, C., King, J. A., (2016), *ACS Chem. Biol.*, 11, 263-272. B) Dominguez-Calva, J. A., Haase-Pettingell, C., Serebryany, E., King, J. A., Quintanar, L. (2018), *Biochemistry*, 57, 4959-4962. C) Palomino-Vizcaino, G., Schuth, N., Dominguez-Calva, J. A., Rodriguez-Meza, O., Martinez-Jurado, E., Serebryany, E., King, J. A., Kroll, T., Costas, M., Quintanar, L. (2023), *J. Am. Chem. Soc.*, 145, 12, 6781-6797. [3] Tovar-Ramirez, M. E., et al. (2023). *Inorganic Chemistry*, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.3c00794>.

HUELLA DIGITAL POR RAYOS REVELA UN MECANISMO DE COMUNICACIÓN DE LARGO ALCANCE EN LA PROTEÍNA EFL1 Y SU ALTERACIÓN POR UNA MUTACIÓN CLÍNICA

Abril Gijsbers¹, Jonathan Zúñiga Domínguez¹, Rohit Jain², Jesús Pérez Juárez¹, Erick R. Farquhar², Mark R. Chance² and Nuria Sánchez Puig¹

1. Instituto de Química, departamento de Química de Biomacromoléculas, UNAM, 04510, Ciudad de México, México, y 2. Center for Synchrotron Biosciences, Case Western Reserve University, School of Medicine, Cleveland, 44106 Ohio, EUA. abrilgijsbers@gmail.com

Huella digital por rayos X, comunicación a largo alcance, cambio conformacional

Introducción. La proteína EFL1 es una GTPasa que en conjunto con su proteína efectora SBDS liberan al factor de anti-asociación eIF6 de la subunidad ribosomal 60S como último paso antes de entrar a traducción. Se ha visto que mutaciones en EFL1, como la R1095Q, causan el síndrome Shwachman Diamond (Stepensky et al., 2017); sin embargo, se desconoce el mecanismo afectado. Estudios de calorimetría sugieren que la GTPasa silvestre sufre un cambio conformacional al unir su sustrato, mientras que en la mutante este cambio es mínimo (Perez-Juarez et al., 2022).

En este trabajo utilizamos la huella digital medida por irradiación con rayos X (en inglés X-ray footprinting) para medir el cambio conformacional que sufre el ortólogo de EFL1 de levadura al unir GTP, y la diferencia que existe en la mutante R1086Q, equivalente a la mutación R1095Q en la proteína humana.

Metodología. La proteína silvestre y mutante fueron irradiadas a distintos tiempo con rayos X en presencia y ausencia del ligando GTP. Posteriormente, se llevó a cabo una proteólisis, y una separación/detección de los péptidos mediante UHPLC acoplado a un detector de espectrometría de masa. Se identificaron las fracciones modificadas por radicales libres y no modificadas de cada péptido, y se graficaron en contra del tiempo de irradiación para calcular la velocidad de modificación. Péptidos fueron normalizados por la reactividad de sus residuos y mapeados en modelos estructurales para su comparación entre condiciones.

Resultados. Se alcanzó una cobertura de secuencia de aproximadamente 80% para cada condición, teniendo péptidos en cada dominio de la proteína. Resultados muestran que péptidos en el dominio catalítico de la proteína silvestre se protegen al unirse GTP, mientras que péptidos en el resto de la proteína se exponen. En contraste, la proteína mutante muestra un comportamiento totalmente distinto al unir GTP con exposición de péptidos en gran parte de la proteína, incluido el sitio catalítico (figura 1).

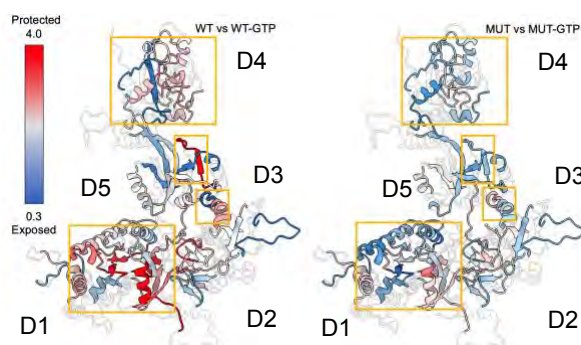


Fig. 1. Comparación entre los cambios sufridos por la proteína silvestre al unirse GTP contra los cambios en la proteína mutante R1086Q. Recuadros amarillos resaltan regiones con comportamientos opuestos.

Conclusiones. EFL1 muestra un mecanismo de comunicación a largo alcance donde la unión de nucleótidos en el dominio catalítico (dominio 1) desencadena un reacomodo de regiones a lo largo de la proteína hasta el dominio efector (dominio 4). La mutación R1086Q en este último dominio cambia la dinámica de la proteína, sugiriendo que las proteínas con o sin ligando se encuentran en conformaciones distintas, siendo esta la razón por la que EFL1 no puede ejercer su función de liberar al factor eIF6.

Agradecimiento. Financiamiento DGAPA-PAPIIT IN215122.

Bibliografía.

- Perez-Juarez, J., Tapia-Vieyra, J. V., Gutierrez-Magdaleno, G., & Sanchez-Puig, N. (2022). Altered Conformational Landscape upon Sensing Guanine Nucleotides in a Disease Mutant of Elongation Factor-like 1 (EFL1) GTPase. *Biomolecules*, 12(8).
- Stepensky, P., Chacon-Flores, M., Kim, K. H., Abuzaitoun, O., Bautista-Santos, A., Simanovsky, N., Siliqi, D., Altamura, D., Mendez-Godoy, A., Gijsbers, A., Naser Eddin, A., Dor, T., Charrow, J., Sanchez-Puig, N., & Elpeleg, O. (2017). Mutations in EFL1, an SBDS partner, are associated with infantile pancytopenia, exocrine pancreatic insufficiency and skeletal anomalies in a Shwachman-Diamond like syndrome. *J Med Genet*, 54(8), 558-566.

LAS CATALASAS DE SUBUNIDAD GRANDE TAMBIÉN SON CHAPERONAS

Teresa Nava Ramírez, Sammy Gutiérrez Terrazas, Wilhelm Hansberg
Departamento Biología Celular y del Desarrollo, Lab. 103 oriente, Instituto de Fisiología Celular,
UNAM. Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán,
Ciudad de México, C.P. 04510, MÉXICO whansberg@ifc.unam.mx

Palabras clave: dominio C-terminal, mecanismo de acción, efectos in vivo

Introducción. Las hemo-catalasas presentan dos formas estructurales: las de subunidad pequeña y las de subunidad grande. Las grandes son muy semejantes a las pequeñas en secuencia de aminoácidos y en estructura, pero tienen un dominio C-terminal (TD) adicional de 150-190 aminoácidos. La función del TD ha sido un misterio por mucho tiempo, pues no se requiere para la actividad de catalasa. El TD confiere una gran estabilidad a la catalasa (1), pero además, el TD proviene probablemente de una Hsp31 bacteriana y tiene actividad de chaperona (1,2). Las chaperonas o desestructurasas como la Hsp31 son proteínas que permiten que las proteínas mal plegadas recuperen su conformación nativa activa.

El objetivo de este trabajo es determinar el mecanismo de acción de desestructurasa de la Catalasa-3 (CAT-3) de *Neurospora crassa* y analizar por separado el efecto que tienen *in vivo* el dominio de catalasa (CDC3) y el dominio de desestructurasa (TDC3).

Metodología. Utilizamos como ensayo la desnaturalización a 45°C de la alcohol deshidrogenasa. Se analizó el efecto del bis-ANS y de la fuerza iónica sobre la actividad de desestructurasa. Mediante mutagénesis del TDC3 se determinó si éste funciona como dímero o como monómero y dónde se localiza la actividad de desestructurasa. Con la expresión en *Escherichia coli* del CDC3 y el TDC3 se midió el efecto en la supervivencia de la bacteria a un choque de calor o a un tratamiento con H₂O₂. En *N. crassa* se sustituyó el TD de la CAT-3 por la GFP y se introdujo la construcción en el gen *cat-3*; el mCherry se fusionó al TDC3, se le añadió un promotor inducible y se introdujo la construcción en el gen *his-3*. Mediante cruza se obtuvo la cepa con las dos construcciones.

Resultados. Sustituyendo una Gln por una Cys en una hélice que forma la interface entre dos monómeros del TDC3 se observó que el dímero tiene el doble de la actividad de desestructurasa que el monómero con la Cys derivatizada con NEM o con glutatión. Utilizando el compuesto bis-ANS se observó que los aminoácidos hidrofóbicos que se exponen con el calor están en el TD y se requieren para su actividad de chaperona. Tanto el bis-ANS como la fuerza iónica disminuyen

esta actividad. El asa C-terminal del TDC3 sólo tiene aminoácidos hidrofóbicos y cargados y la eliminación de los últimos 17 aminoácidos del TDC3 cancela la mayor parte de la actividad de chaperona; la sustitución de alguno de sus aminoácidos disminuye la actividad. La expresión de la CAT-3 o del TDC3 en una cepa de *E. coli* que no tiene catalasa, protege a la bacteria del choque de calor a 55°C y también del estrés oxidante; la actividad de chaperona a bajas concentraciones y la actividad de catalasa a altas concentraciones de H₂O₂. En *N. crassa* la actividad de CAT-3 se requiere para la germinación de los conidios. Tanto el dominio de catalasa como el de chaperona son importantes para crecer a 30°C y sobre todo a 42°C. La actividad del TDC3 se requiere fuera de la célula y es indispensable para la ramificación normal de las hifas. La cepa con las dos construcciones restablece el fenotipo de la cepa silvestre, tanto en la germinación de los conidios, en el crecimiento, como en las distintas fases de la reproducción asexual.

Conclusiones. 1) El dímero del TDC3 tiene mayor actividad de chaperona que el monómero. 2) Se requieren aminoácidos hidrofóbicos y cargados para la actividad de desestructurasa. 3) La actividad de chaperona se localiza principalmente en los últimos 17 aminoácidos del TDC3. 4) La CAT-3 y el TDC3 protegen a *E. coli* de un choque de calor y del estrés oxidante. 5) Se requiere el CDC3 y el TDC3 para crecer y diferenciarse como cepa silvestre. 6) Las cepas que no tienen un TDC3 extracelular tienen alteraciones morfológicas en las puntas de crecimiento y en las hifas secundarias.

Agradecimiento. PAPIIT IN216920, IN226723; CONAHCYT CF 214979

Bibliografía.

1. Hansberg W*, Nava-Ramírez T, Rangel-Silva P, Díaz-Vilchis A, Mendoza-Oliva A (2022) Antioxidants 11(5): 979 (1-16)
2. Hansberg W (2022) Monofunctional heme-catalases. Antioxidants 11(11): 2173 (1-28)
3. Nava-Ramírez T, Hansberg W* (2020) Free Radic Biol & Med 156: 99-106.
4. Nava-Ramírez T, Gutiérrez-Terrazas S, Hansberg W (2023) Antioxidants 12(4): 839 (1-13)

LA FORMACIÓN DE PORO DE LAS TOXINAS CRY DE *BACILLUS THURINGIENSIS* INVOLUCRA CAMBIOS CONFORMACIONALES DRÁSTICOS EN LAS HÉLICES-ALFA DEL EXTREMO N-TERMINAL DE LA TOXINA.

Sabino Pacheco, Isabel Gómez, Mario Soberón and Alejandra Bravo.
Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Microbiología molecular. Cuernavaca Morelos CP 62210. alejandra.bravo@ibt.unam.mx
Bacillus thuringiensis, formación de poro, cambios estructurales

Introducción. Las toxinas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis* matan insectos porque forman poros en las células del intestino larvario de insectos susceptibles. Están compuestas de tres dominios donde el Dominio I está involucrado en la oligomerización y la inserción de membrana, mientras que los dominios II y III participan en la unión a receptores y en la especificidad. Sin embargo, los cambios estructurales de la toxina involucrados en la inserción de membrana no se conocen. El modelo más aceptado es el “modelo del paraguas”, que propone que la horquilla α -4/ α -5 del Dominio I es la región que se inserta en la membrana. Sin embargo, existen contradicciones en este modelo.

Metodología. Para determinar la topología de Cry1Ab cuando se inserta en la membrana, se generaron enlaces disulfuro que unen hélices α del Dominio I restringiendo su movilidad. Además realizamos análisis FRET en dos dimensiones, midiendo distancias de diferentes puntos en la toxina al plano de la membrana. También analizamos la exposición al solvente de diversos residuos marcados con colorantes fluorescentes, por medio de ensayos de apagamiento colisional utilizando KI como apagador, comparando la proteína soluble con el estado insertado en la membrana.

Resultados. Enlaces disulfuro entre hélices α -2/ α -3 o α -3/ α -4 perdieron oligomerización y toxicidad, lo que indica que el movimiento de estas hélices es necesario para la actividad insecticida. Por el contrario, los enlaces disulfuro que unen las hélices α -5/ α -6 no afectaron la toxicidad, lo que contradice al “modelo del paraguas”.

Las hélices α -1 a α -4 se localizan más cerca de la membrana que el resto de la proteína y los residuos marcados en estas hélices están protegidos del solvente. Demostramos que la toxina Cry sufre cambios conformacionales muy importantes en el extremo N-terminal del Dominio I durante la inserción de la toxina en la membrana.

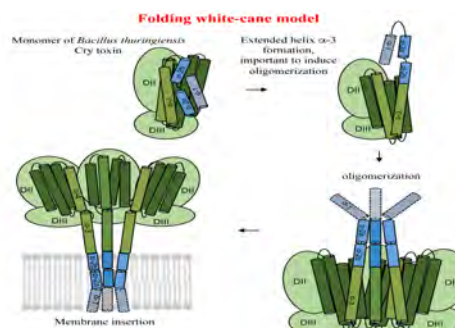


Figura 1. Cambios conformacionales de la toxina Cry de Bt en el modelo de bastón plegable

Conclusiones. Proponemos que las hélices α -1 a α -4 participan en la formación de una hélice extendida directamente involucrada en oligomerización e inserción en membrana. Estos datos rompen un paradigma, mostrando un nuevo modelo de “bastón plegable” (Fig 1) que explica mejor los cambios estructurales de las toxinas Cry durante su inserción en la membrana¹.

Agradecimientos. DGAPA: IN206721, IN210722, IN203619 y CONACyT Fronteras CF-6693.

Bibliografía.

1. Pacheco S, Gómez I, Soberón M, Bravo A. 2023 A major conformational change of N-terminal helices of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab insecticidal protein is necessary for membrane insertion and toxicity. **FEBS J.** 290: 2692-27

MOLECULAR UNDERPINNINGS FOR THE ASYMMETRY OF CRE BINDING TO LOXP

Mariana Soto-González, Universidad Tecnológica Emiliano Zapata, Emiliano Zapata, 62760
 Marco A. Ramírez-Martínez and Nina Pastor, Centro de Investigación en Dinámica Celular,
 Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, 62209, nina@uaem.mx

Key words: selectivity, molecular dynamics, protein-DNA interactions

Introduction. Cre is a tyrosine site-specific recombinase that binds its cognate *loxP* site and promotes recombination without loss of information. *LoxP* has two identical 13-bp binding sites, dubbed RBE, as palindromes, separated by an asymmetric 8-bp spacer. Despite having identical binding sites, the two Cre that bind to *loxP* do not engage in the same interactions; this decides which DNA strand will be cut first (1). A structure of *loxP* with two Cre bound was solved recently, using Cre mutants that cannot form a functional intasome (2). This complex (PDB 7RHZ) is indeed asymmetric, but the role of the mutations in Cre in promoting this asymmetry has not been explored. The main goal of this work is to characterize this Cre₂-*loxP* ternary complex for the wild type protein using molecular dynamics simulations to dissect its structural and dynamic properties, to understand the sources of asymmetry.

Methods. Starting from 7RHZ, we reverted all Cre mutations to the wild type sequence and rebuilt all missing residues, from 20 to 341, using SwissModel (3). The *loxP* site was flanked at both ends with a GC bp step with distance restraints enforcing Watson-Crick H-bonds to avoid fraying. The repaired complex was solvated with TIP3P water and 0.15M NaCl, and the simulations were run in Gromacs 2020 (4) with the CHARMM36m force field (5). We ran two 5 μ s replicas.

Results. Two critical residues for catalysis are Y324 and K201. Y324 gets within 5Å of the target phosphate only in one Cre. K201 resides in a flexible loop that was not solved in 7RHZ; accordingly, it samples a wide range of distances to the scissile phosphate in the 8-bp spacer. This happens for both binding sites but is more dramatic for the Cre that places Y324 near the phosphate. We did not find any instance of a complete active site in either Cre. This is important to avoid cutting DNA before the intasome is formed. Asymmetry could be due to steric conflicts between the two bound Cre in the context of a slightly bent *loxP*. The N-terminal domains of Cre face each other, but they do not engage in long-lasting or intasome-like interactions. The latter would require rotation of one domain with respect to the other, a motion that is hindered by the

interactions of helices B and D in these domains with the major groove of DNA.

The C-terminal catalytic domains increase their interactions along the simulations. This can be explained by the reversal of a mutation in the docking site for helix N (R192A), which now allows reciprocal (though not identical) interactions between the negatively charged residues in helix N and R192 during domain swapping among both Cre.

The number of contacts of each Cre to *loxP* is different, being larger for the subunit that can place the catalytic Y324 near the scissile phosphate. While it is generally accepted that Cre does not read directly the sequence at the spacer, there are many instances of Cre-DNA interactions, with the phosphates and the bases, in both grooves, along all *loxP*. The RBE palindrome is broken at the spacer, and Cre engages different residues to read the base edges, resulting in an asymmetric interface between the catalytic domains.

Conclusions. The N-terminal domain is not the main candidate to explain asymmetry in binding, as these domains do not interact strongly in the Cre₂-*loxP* complex. The C-terminal domain, once the R192A mutation is reversed, engages in more symmetric interactions as the simulations progress, suggesting that the original asymmetry in 7RHZ was due, partly, to this point mutation. As the sequence in the spacer is not palindromic, sequence and/or conformation-specific interactions with DNA also break the symmetry at the domain interface.

Acknowledgements. We thank LANCAD and the Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México for supercomputing time. MARM thanks CONACyT for a Ph.D. scholarship (858905).

References.

1. Meinke G, Bohm A, Hauber J, Pisabarro MT, Buchholz F (2016) *Chemical Reviews* 116:12785-12820
2. Stachowski K, Norris AS, Potter D, Wysocki VH, Foster MP (2022) *Nucleic Acids Research* 50:1753-1769
3. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, *et al.* (2018) *Nucleic Acids Research* 46: W296-W303
4. Páll S, Zhmurov A, Bauer P, Abraham M, Lundborg M, Gray A, Hess B, Lindahl E. (2020) *J. Chem. Phys.* 153: 1344110
5. Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, Grubmüller H, MacKerell Jr AD (2016) *Nature Methods* 14:71-73

DISEÑO DE REGIONES DESORDENADAS SINTÉTICAS SENSIBLES A LOS CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL AMBIENTE

César A. Ponce Diego, Cesar L. Cuevas Velázquez. Departamento de bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, 04510, Ciudad de México, CDMX. cuevas@quimica.unam.mx

Palabras clave: IDR, diseño de novo, sensibilidad estructural

Introducción. Aquellas proteínas sin estructura tridimensional estable, llamadas IDPs o IDRs, pueden asociarse con funciones específicas de acuerdo con su entorno químico. Al modificar las condiciones químicas, pueden adquirir una estructura estable. Usando una biblioteca de 200 biosensores basados en IDRs, investigamos las características moleculares que influyen en la sensibilidad estructural. Analizamos parámetros de las secuencias de las IDRs para establecer correlaciones y patrones. Con algoritmos de machine learning, identificamos propiedades físicoquímicas que distinguen IDRs con alta y baja sensibilidad estructural. Estos parámetros permitirán el diseño de IDRs sintéticas con sensibilidad estructural controlada ante condiciones de estrés hiperosmótico.

El objetivo es diseñar proteínas sintéticas con distintos niveles de sensibilidad estructural mediante herramientas de aprendizaje automático y aprendizaje profundo con un enfoque de biología sintética y evaluar su comportamiento en células vivas sometidas a condiciones de choque hiperosmótico.

Metodología. Se evaluó la sensibilidad estructural de 200 biosensores basados en IDRs en células de levadura bajo diferentes concentraciones de NaCl. Las IDRs se clasificaron en grupos de respuesta alta, media y baja según el parámetro de Δ FRET. Se caracterizaron las IDRs utilizando programas y se generó una base de datos con parámetros como kappa, FCR, NCP, hidropatía, SCD, SHD, entre otros. Se aplicaron algoritmos de machine learning para identificar agrupamientos de IDRs con parámetros similares y se diseñaron IDRs sintéticas.

Resultados.

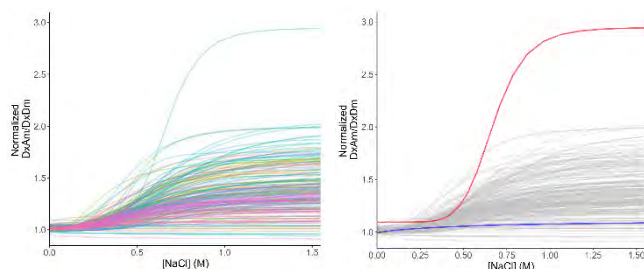


Fig. 1. Curva dosis-respuesta de las IDRs de la biblioteca de biosensores. La curva con mayor respuesta de FRET corresponde a una proteína llamada CAHS, proveniente de tardígrado.

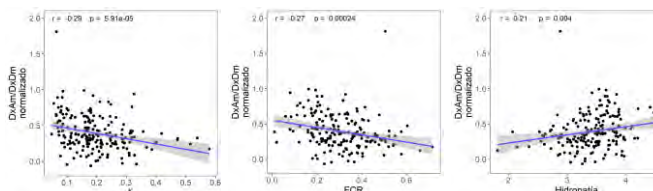


Fig. 2. Gráficos de correlación de parámetros de CIDER vs Δ FRET. Los parámetros de kappa, FCR e hidropatía ya se han caracterizado para grupos de IDRs.

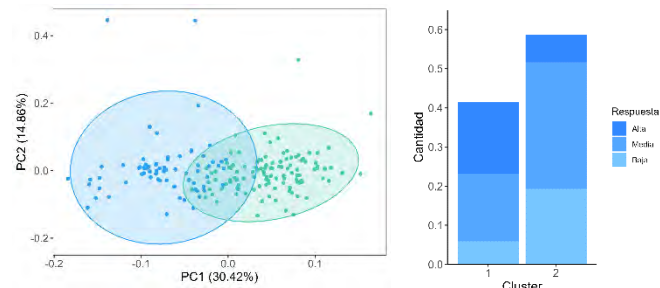


Fig. 3. Izquierda: gráfico de clúster de las IDRs de la biblioteca de biosensores. El clúster azul se designó como clúster 1; el clúster verde como clúster 2. Derecha: gráfico de barras mostrando la frecuencia de cada grupo de respuesta de la biblioteca de IDRs dentro de los clústeres.

Conclusiones. El uso de algoritmos de machine learning no supervisado identifica las propiedades físicoquímicas que influyen en la sensibilidad estructural de las IDRs bajo estrés hiperosmótico.

Agradecimiento. Agradecemos el apoyo otorgado por el Consejo de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca proporcionada.

Bibliografía.

- Cuevas-Velazquez, C. L., Saab-Rincón, G., Reyes, J. L., & Covarrubias, A. A. (2016). The unstructured n-terminal region of Arabidopsis group 4 late embryogenesis abundant (LEA) proteins is required for folding and for chaperone-like activity under water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, 291(20), 10893–10903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.720318>
- Lotthammer, J. M., Ginell, G. M., Griffith, D., Emenecker, R. J., & Holehouse, A. S. (2023). Direct Prediction of Intrinsically Disordered Protein Conformational Properties From Sequence. *BioRxiv*, 2023.05.08.539824. <https://doi.org/10.1101/2023.05.08.539824>

Estudio estructural de la inulinasa ISO3 *Kluyveromyces marxianus*.

Jonathan Trapala^a, Martín González Andrade^b, Maribel Cayetano^b, Ismael Bustos Jaimes^b, Carmina Montiel^a ^aFacultad de Química, UNAM, México City 04510, México. ^bFacultad de Medicina, UNAM, México City 04510. Correo: trapala@comunidad.unam.mx

Palabras clave: Inulinasa, dinámica molecular, mutagénesis dirigida

Introducción. En México existe una gran variedad de agaves de los cuales se producen bebidas alcohólicas con alto valor en el mercado como el tequila o el mezcal. Los residuos de esta industria son ricos en fructanos como la agavina, polímero de fructosa ramificado, que presenta enlaces β -(2-1) y β -(2-6). En la actualidad existen pocas enzimas que degradan a este carbohidrato(1). Una de ellas es la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* ISO3n (Inu-ISO3), obtenida a partir de residuos de bagazo de agave. De estas enzimas solo se tiene entendido la relevancia de los tres motivos conservados que se encuentran en la cavidad catalítica, pero aún se requiere estudiar más afondo la participación de otros aminoácidos cercanos a estos motivos. Tomando como objeto de estudio esta proteína se encontró por ensayos de dinámica molecular y cinética enzima la importancia de los aminoácidos Trp79, Phe113 y Gln236 presentes en la cavidad catalítica en el reconocimiento y catálisis de la inulina de chicoria, agavina y sacarosa (2).

Metodología.

Clonación, expresión, purificación y comparación de las propiedades cinéticas de la enzima recombinante de Inu-ISO3 con la enzima silvestre (2).

Usando el cristal 6j0t de la inulinasa de *K. marxianus* obtenido del PDB, se realizaron las dinámicas moleculares y el cálculo de la energía de unión con inulina de chicoria, agavina y sacarosa. Los aminoácidos con mayor aporte energético fueron mutados por Ala usando la metodología de Xia (3). Las mejores mutantes se probaron experimentalmente.

Resultados. Se obtuvo la inulinasa recombinante de *K. marxianus* la cual tiene características similares a la proteína silvestre como el peso molecular (256 kDa rInu-ISO3 Vs 259 kDa Inu-ISO3), ambas presentan glicosilaciones y son homo dímeros.

Usando dinámica molecular se logró observar que los complejos inulinasa-sustrato analizados eran estables durante un intervalo de 10 ns de simulación. Con estas simulaciones fue posible calcular la energía de unión para seleccionar aminoácidos a mutar como se muestra en la figura 1.

Una vez identificados los aminoácidos a mutar los cuales fueron: Trp79, Phe113, Gln236, Gln339 se

obtuvieron las enzimas mutadas con alanina y se determinaron sus valores cinéticos (Tabla 1).

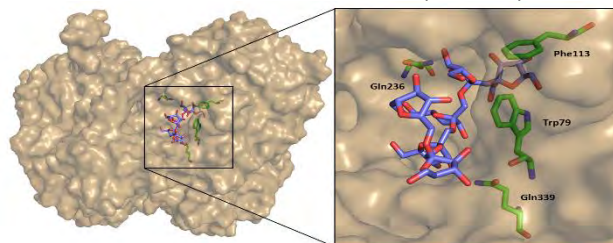


Fig. 1. Aminoácidos con máxima energía de unión a mutar del complejo de la inulinasa de *K. marxianus* con inulina de chicoria generado por dinámica molecular.

Se observó que de las 4 mutantes propuestas 3 presentan un impacto importante en la actividad enzimática. La Trp79Ala provocó la pérdida del 98% de la actividad en los tres sustratos analizados. Por otro lado, la Phe113Ala y la Gln236Ala provocaron una reducción en la actividad hidrolítica de los fructanos y un aumento en la actividad con sacarosa.

Tabla1. Valores de eficiencia catalítica de las distintas mutantes probadas.

| Mutación | Inulina (mM ⁻¹ s ⁻¹) | Agavina (mM ⁻¹ s ⁻¹) | Sacarosa (mM ⁻¹ s ⁻¹) |
|------------------|--|--|---|
| Silvestre | 684 ± 34.2 | 328 ± 16.4 | 9.1 ± 0.5 |
| Trp79Ala | ND | ND | 0.1 ± 0.01 |
| Phe113Ala | 27.6 ± 1.7 | 37.5 ± 3.4 | 37.5 ± 2.6 |
| Gln236Ala | 53.5 ± 2.8 | 36.3 ± 1.8 | 53.5 ± 6.4 |
| Gln339Ala | 173 ± 4.6 | 128 ± 6.0 | 10.5 ± 1.3 |

Conclusiones. Las mutantes obtenidas por el análisis in silico permitieron obtener algunos aminoácidos relevantes en el reconocimiento y catálisis de los carbohidratos analizados. La Trp79Ala provoca la pérdida de la actividad para todos los sustratos, mientras que las Phe113Ala y Gln236Ala cambia la actividad de la enzima de una inulinasa a una invertasa.

Agradecimiento. Se agradece por el financiamiento a DGAPA-UNAM (Grant PAPIIT IN219520) y a CONAHCYT por la beca de doctorado.

Bibliografía. (1) López M., Mancilla-Margalli N., Mendoza-Díaz G., (2003), Polys., 7835-7839.
(2) Trapala J., González-Andrade M., Olvera C., Cayetano-Cruz M., Sanz-Aparicio J., Jimenez-Ortega E., Bustos-Jaimes Montiel C., (2023), Int. J. Biol. Macromol.
(3) Xia Y., Chu W., Qi Q., Xun L., (2015) Nucleic acids res.

PAPEL DE UN LAZO SOBRESALIENTE DEL DOMINIO B EN LA ESPECIFICIDAD DE REACCIÓN DE LA 4- α -GLUCANOTRANSFERASA DE *THERMOTOGA MARITIMA*

Alexey Llopiz^{1*}, Marco A. Ramírez-Martínez², Leticia Olvera¹, Wendy Xolalpa-Villanueva¹, Nina Pastor², Gloria Saab-Rincon¹

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, CP 62210 México. ²Centro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, UAEM. Cuernavaca, México. *Correspondencia a alexey.llopiz@ibt.unam.mx.

Palabras clave: transglicosilación, especificidad, dinámica

Introducción. Las glicosil hidrolasas catalizan la modificación de polisacáridos como el almidón y el glucógeno. Sin embargo, su mecanismo de reacción implica la competencia entre hidrólisis y/o transglicosilación, cuyo balance parece depender de la estructura enzimática y de su capacidad evolutiva (1). La comparación de las estructuras de la 4- α -glucanotransferasa de *T. maritima* (*TmGTasa*) y la α -amilasa de *T. petrophila* (*AmyS*) reveló que el lazo 130s con un W(131) en su punta, solo está presente en la *TmGTasa* (Fig. 1). Para evaluar su función en la especificidad de reacción, se construyeron dos variantes de esta proteína: (1) W131G y (2) deleción de los residuos 120-124/128-131.

Objetivo: evaluar la función de elementos estructurales diferenciales de la *TmGTasa* en la especificidad de reacción.

Metodología. Las variantes se obtuvieron por mutagénesis dirigida y las proteínas expresadas en *E. coli* se purificaron por cromatografía de afinidad usando la cola de 6xHis presentes en estas proteínas. La integridad de la estructura secundaria de las proteínas fue medida mediante dicroísmo circular (CD). La actividad transglicosídica fue por el método del Lugol (2) y la hidrolítica por el del DNS (3). El perfil de pH-actividad se realizó en el rango de pH 3-11. La determinación de V_{max} y K_m se realizó usando una concentración constante de almidón y variando la de maltosa. El análisis de la estructura secundaria fue por CD y las MD se realizaron durante 400 ns.

Resultados. Las tres especies de la *TmGTasa* fueron obtenidas con un elevado grado de pureza (análisis por SDS-PAGE). Las mutaciones no alteraron sustancialmente la estructura secundaria de las proteína según los resultados de CD. En cambio, la relación de H/T de las variantes W131G y del lazo acortado aumentaron 11.6 y 11.4 veces relativos a la forma WT, respectivamente. Estos cambios fueron fundamentalmente por la reducción en la transglicosilación, lo que se evidenció en la disminución en alrededor de 10 veces de la V_{max} , sin

un cambio relevante en la afinidad por la maltosa (aceptor). Para racionalizar los cambios observados, se determinaron los perfiles de pH-actividad, los que indicaron una perturbación en las propiedades físicoquímicas del sitio activo. El análisis por MD permitió explicar los cambios producidos en la relación de H/T en términos de la flexibilidad en la vecindad del centro activo, sobre todo en regiones que comprenden zonas flexibles de esta proteína.

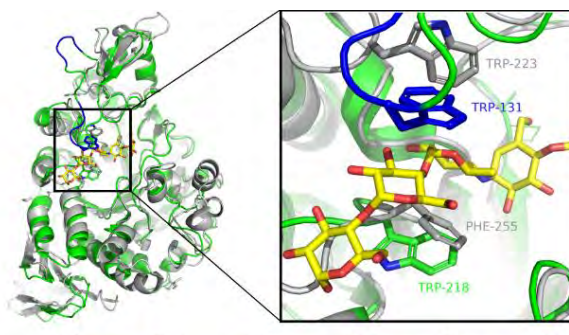


Fig. 1. Sitios para modificar en la *TmGTasa* (verde y azul, PDB ID 1LWJ). El lazo 130s que comprende los residuos 120-124 y 128-131 es más alargado en la *TmGTasa* que en la *AmyS* (gris, PDB ID 5M99).

Conclusiones. Ambas mutantes de la *TmGTasa* tuvieron una H/T alrededor de 12 veces mayor que la WT, fundamentalmente por la reducción de la transglicosilación. Este efecto puede ser explicado mediante la perturbación de la dinámica de los residuos catalíticos asociado a los cambios en el dominio B.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por DGAPA-UNAM (PAPIIT Grant No. IN211020 y IN226623 a G.S.R.), y CONACYT (Núm 958307, A. L.).

Bibliografía.

1. Leemhuis H, Dijkstra BW, Dijkhuizen L. FEBS Lett. 2002 Mar 13;514(2-3):189-92.
2. Liebl W, Feil R, Gabelsberger J, Kellermann J, Schleifer K-H. Eur J Biochem. 1992;207(1):81-8.
3. Miller GL. Anal Chem. 1959;31(3):426-8.

DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS DE PROTEÍNA CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA

Eddie Guillermo Sánchez-Rueda, Armando Hernández-García. Instituto de Química, Departamento de Química de Biomacromoléculas, UNAM. Ciudad de México, C.P. 04510.
eddie.sanchezr@gmail.com, armandohg@iquimica.unam.mx

Palabras clave: nanopartículas, proteína, autoensamblaje

Introducción. El rápido incremento de la resistencia ante los antimicrobianos pone de manifiesto la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas. En este proyecto se desarrollaron nanopartículas (NPs) para evaluar su uso como sistemas de entrega de péptidos antimicrobianos (AMPs). La construcción de estas nanopartículas está basada en la proteína C-S-B, que fue previamente diseñada, de manera racional, con tres bloques funcionales que le permiten autoensamblarse para formar nanopartículas [1]. Debido a este diseño, se le puede adicionar un cuarto bloque, constituido por algún péptido bioactivo. En este proyecto se evaluó la adición de dos péptidos: aureína 1.2 y miximidina, de los cuales ya se conoce su actividad contra distintas bacterias gram-positivas y gram-negativas [2,3].

El objetivo de este proyecto es evaluar el efecto en la actividad de los péptidos antimicrobianos cuando son fusionados a la proteína C-S-B que forma nanopartículas.

Metodología. Mediante biología molecular se adicionó la secuencia de los péptidos candidatos al vector de la proteína C-S-B. Posteriormente las proteínas fueron expresadas en la levadura *Pichia pastoris* y purificadas mediante precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio y acetona. La identidad de las proteínas fue verificada mediante SDS-PAGE, Western-Blot y MALDI-TOF. Posteriormente, se evaluó la capacidad de las proteínas para formar nanopartículas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). A continuación, se evaluó la actividad antibacteriana de las nanopartículas contra *E. coli*, mediante ensayos de microdilución en placa y se caracterizó el efecto de estas sobre la membrana bacteriana mediante AFM.

Resultados. En la figura 1 se muestra el diseño general de las proteínas y las nanopartículas, así como la morfología de estas últimas, caracterizada mediante AFM. Se encontró que estas poseen actividad antibacteriana (posiblemente bacteriostática) en rangos que van desde 15 μM hasta 150 μM (figura 2). Mediante AFM se observó el efecto que las NPs tienen sobre la superficie de *E. coli* (figura 3).

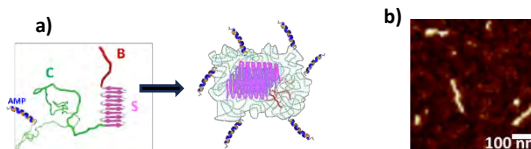


Fig. 1. a) Esquema general del diseño de las proteínas y la formación de nanopartículas. b) Microscopía de fuerza atómica de las nanopartículas construidas con la proteína Aureína-C-S-B.

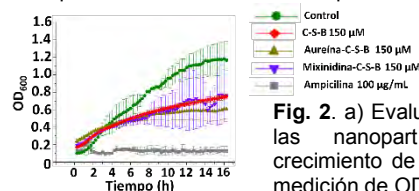


Fig. 2. a) Evaluación del efecto de las nanopartículas sobre el crecimiento de *E. coli* mediante la medición de OD₆₀₀.

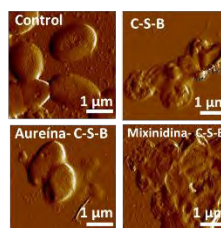


Fig. 3. a) Micrografías de AFM de *E. coli* después de un tratamiento de 9 horas con las distintas nanopartículas.

Conclusiones. Las nanopartículas ensambladas con las proteínas C-S-B, Aureína-C-S-B y Miximidina-C-S-B demostraron poseer actividad antibacteriana. Las caracterizaciones mediante AFM sugieren que sus mecanismos de acción ocurren a nivel de la membrana, y presentan variaciones según la molécula bioactiva que poseen.

Agradecimiento. CONACyT Frontera de la Ciencia 2019 (160671). Se agradece al CONAHCYT por la beca recibida para estudios de posgrado. A Ximena del Toro Ríos, Odiseo Hernández Cortés, Brenda Cruz García y Laura Valentinotti por su ayuda en la producción y purificación de proteínas.

Bibliografía.

[1] Hernandez-Garcia, A., Kraft, D., Janssen, A., Bomans, P., Sommerdijk, N., Schoot, P., Stuart M.C. & de Vries, R. (2014). *Nanotechnol.*, 9(9), 698–702.
[2] Rai, D. K., & Qian, S. (2017). *Scientific reports*, 7(1), 3719.
[3] Cantisani, M., Leone, M., Mignogna, E., Kampanaraki, K., Falanga, A., Morelli, G., Galdiero, M., Galdiero, S. (2013). *Antimicrob Agents Chemother.* 57(11):5665-73.

FUNCTIONAL EXPRESSION OF A NOVEL PEROXYGENASE FROM *SPHAEROBOLUS STELLATUS*

¹Alina Torres, ¹Marcela Ayala, ²Mayra Avelar, ³Miguel Alcalde

¹Instituto de Biotecnología, Morelos México, 62210 ; ²Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas México, 98000 ; ³Instituto de Catálisis y Petroleoquímica ICP, CSIC, Madrid España.
alina.torres@ibt.unam.mx 5567908256

Keywords: *peroxygenase, yeast expression, structural analysis.*

Introduction. Unspecific peroxygenases (UPOs) are extracellular fungal enzymes that catalyze oxidation reactions using hydrogen peroxide as electron acceptor [1]. UPOs catalyze a wide variety of oxidation reactions such as epoxidation, dealkylation, hydroxylation, one and two-electron oxidations of aromatic and heterocyclic compounds, inorganic halides, and organic heteroatoms [1]; Up to now, most studied UPO is from *Agrocybe aegerita* (AaeUPO), and only a small number of UPOs have been characterized. These enzymes are considered promiscuous catalysts due to the diversity of substrates they recognize, making them attractive biocatalysts for many potential applications. Over 1,000 UPO-like genes have been identified in genomic databases, particularly in basidiomycete genomes [2].

In this work, we accomplished the heterologous expression of a UPO-like gene from the fungi *Sphaerobolus stellatus* (SstUPO).

Experimental strategy. The hypothetical SstUPO was selected based on structural considerations, through a homology model generated by Swiss-model, such as conservation and orientation of key residues, 3D-structural similarity to known UPOs, and relevant properties such as the amino acid composition of the active site [3]. For SstUPO expression, a *S. cerevisiae*-based system was used.

Results. SstUPO promises to be a novel member of this family that could expand the knowledge about the versatility of UPOs. The analysis of the model (**Fig. 1A**) suggests it is similar to AaeUPO, but the substrate access channel is different, as it contains less aromatic amino acids. For nt-SstUPO expression, an extracellular activity of 0.1 U/L is rather low. In order to reach a higher extracellular activity of this UPO-like for further biochemical and catalytic characterization, we followed two previously reported strategies [4,5]: **1. Ev-SstUPO:** The native signal peptide of SstUPO was replaced by the evolved signal peptide for an AaeUPO variant named PaDa-I, and **2. V71I/F252V-SstUPO:** adoption of evolutionary secretion mutations of PaDa-I (**Fig.1B**). Results are shown in **Figure 1C**.

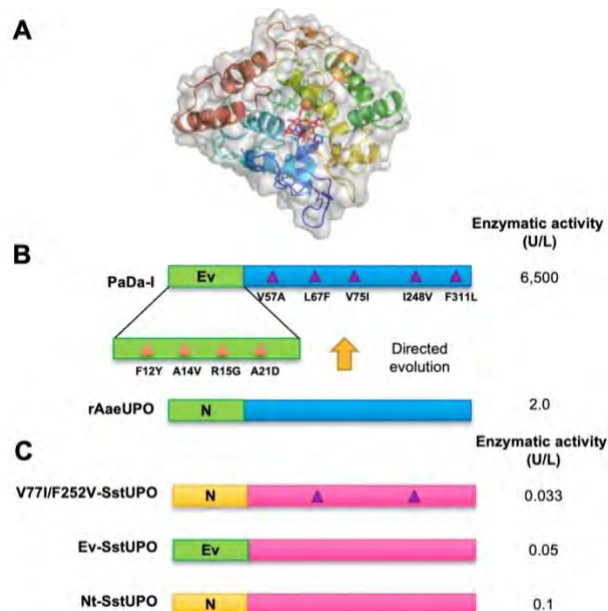


Fig. 1. A. Homologous model of SstUPO. B. Directed evolution of AaeUPO [5]. C. Enzymatic activity of SstUPO variants.

Conclusion. A novel member of the UPO family from *Sphaerobolus stellatus* was successfully expressed in a recombinant system. Further work will consist of increasing extracellular activity levels.

Acknowledgments. This work was funded by UNAM PAPIIT IN215423 and CONAHCYT scholarship CVU: 924843.

References.

- [1] Hofrichter, et al. Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 116–125 (2014).
- [2] Faiza, M., et al. New insights on unspecific peroxygenases. *BMC Evol. Biol.* **19**, 1–19 (2019).
- [3] Piontek, K., et al. Structural basis of substrate conversion in a new aromatic peroxygenase. *J. Biol. Chem.* **288**, 34767–34776 (2013).
- [4] Molina-Espeja, P. et al. Directed evolution of unspecific peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 3496–3507 (2014).
- [5] de Santos, P. G. et al. Functional Expression of Two Unusual Acidic Peroxygenases from *Candolleomyces aberdarensis* in Yeasts by Adopting Evolved Secretion Mutations. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**, 1–14 (2021).

Posters

TRANSICIONES HELICOIDALES Y FLEXIBILIDAD INTRÍNSECA EN CANALES TRP Y Kv

Daniel Balleza y Abigail García-Morales, Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Tecnológico Nacional de México, campus Veracruz. Veracruz, Ver. MEXICO CP 91897.

daniel.bm@veracruz.tecnm.mx

Palabras clave: Flexibilidad intrínseca, Canales iónicos, Subestructuras 3_{10} y π

Introducción. La evidencia estructural y muchos datos experimentales han demostrado la presencia de subestructuras helicoidales no canónicas (π y 3_{10}) en regiones de gran relevancia funcional tanto en canales TRP como Kv [1,2]. Con el uso de un algoritmo que diseñamos para el cálculo de la flexibilidad intrínseca de cada aminoácido, basado en estructuras de alta resolución, en este estudio evaluamos la posibilidad de que las subestructuras no canónicas se definan con perfiles de flexibilidad característicos.

Metodología. Se diseñó el algoritmo Flexiprot, un predictor de flexibilidad basado en estimaciones de los grados de libertad teóricos para cada uno de los 20 aminoácidos estándar; este predictor correlaciona la movilidad de las cadenas laterales con la conformación de cada residuo [3]. El predictor genera perfiles de flexibilidad basados en el análisis de la secuencia primaria, asignando valores ponderados del factor-B por posición, independientemente de si la secuencia analizada adopta alguna de las estructuras secundarias conocidas o incluso si se trata de un segmento desordenado. Con esta herramienta, se estiman los factores B normalizados (nBf) como una clara indicación de la flexibilidad local

Resultados. A través de un análisis composicional exhaustivo de las secuencias subyacentes a estas subestructuras, encontramos que cada una de ellas está asociada con perfiles de flexibilidad locales característicos. Descubrimos que las transiciones helicoidales de α a π están asociadas con patrones de rigidez local, mientras que las transiciones de α a 3_{10} están principalmente ligadas con perfiles de alta flexibilidad local. También estudiamos la relación entre la flexibilidad y el desorden proteico en el dominio transmembrana de estas proteínas. Al contrastar estos dos parámetros, localizamos regiones que presentan discrepancia estructural en las cuales dichas regiones están presumiblemente implicadas en importantes reordenamientos conformacionales durante la activación de esos canales.

Conclusiones. Como lo sugerimos en un estudio previo [4], las subestructuras 3_{10} son significativamente más flexibles que aquellas que se configuran en compactas hélices π . Además, estas subestructuras están implicadas en importantes reordenamientos e interacciones conformacionales con ligandos específicos.

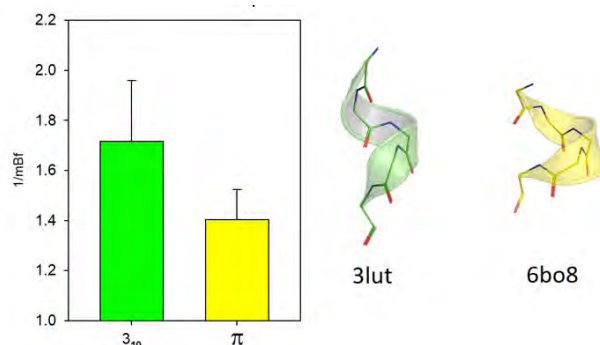


Fig. 1. Flexibilidad relativa de dos subestructuras helicoidales en un canal de potasio Kv (hélice 3_{10} , PDB: 3lut) y un canal TRP (hélice π , PDB: 6bo8). Las hélices 3_{10} son más flexibles que las hélices- π .

Agradecimiento. Este trabajo recibió financiamiento del programa de “Proyectos de investigación científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2022” para Institutos Tecnológicos Federales y Centros (14596.22-P).

Bibliografía.

1. Vieira-Pires RS, Morais-Cabral JH. 3(10) helices in channels and other membrane proteins. *J Gene Physiol.* 2010; 136(6):585-92.
2. Zubcevic L, Lee SY. The role of π -helices in TRP channel gating. *Current Opinion in Structural Biology* 2019; 58:314-323.
3. Smith DK, Radivojac P, Obradovic Z, Dunker AK, Zhu G. Improved amino acid flexibility parameters. *Protein Sci.* 2003; 12(5):1060-72.
4. Balleza D, Rosas ME, Romero-Romero S. Voltage vs. Ligand I: Structural basis of the intrinsic flexibility of S3 segment and its significance in ion channel activation. *Channels Austin* 2019; 13:455-476.

AGGREGATION PATHWAYS OF HUMAN GAMMA S CRYSTALLIN INDUCED BY METAL IONS.

Reinier Felipe Cárdenas Mena, Carlos Amero Tello.

Centro Investigaciones Químicas, UAEM, Cuernava, Morelos CP 62209

carlosamero@uaem.mx

Keywords: metal-induced aggregation, nuclear magnetic resonance, isothermal titration calorimetry.

Introduction. Cataracts are a disease characterized by the opacity of the ocular lens and the consequent deterioration of vision. Crystallins are the most abundant proteins in the human lens eye and the main component of the aggregates observed in cataracts. Several studies have shown that metal ions can induce crystallin aggregation (1,2,3). However, the mechanism by which they induce aggregation is still not entirely clear.

In this work, we analyzed the effect over time of Cu (II) and Zn (II) ions on the aggregation of Human Gamma S Crystallin (H γ S) to propose an aggregation model that corresponds to the available experimental data.

Methodology. To characterize the binding process and subsequent aggregation of crystalline H γ S in the presence of Cu (II) and Zn (II), Nuclear Magnetic Resonance, Isothermal Titration Calorimetry, Dynamic Light Scattering, and Tryptophan Fluorescence experiments were performed in the presence and absence of metal ions.

Results. It was observed that both Cu (II) and Zn (II) specifically interact with H γ S. And while both ions induce aggregation, the conformational change and the thermodynamic are very different.

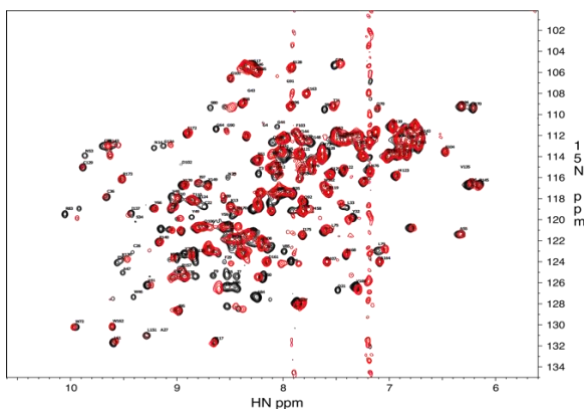


Fig. 1. 1H-15N HSQC spectrum at 37°C in the absence (black) and presence (red) of 1.5 equivalents of Zn²⁺.

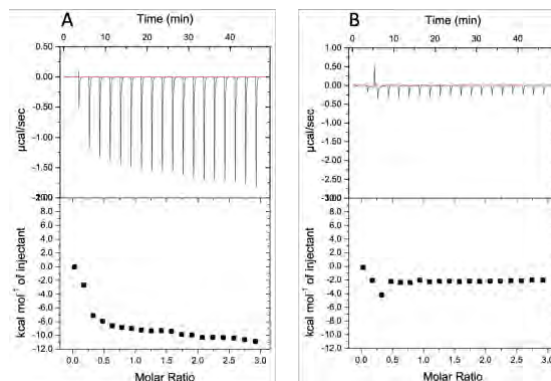


Fig. 2. Calorimetric titration of H γ S with (A) Cu (II), and (B) Zn (II).

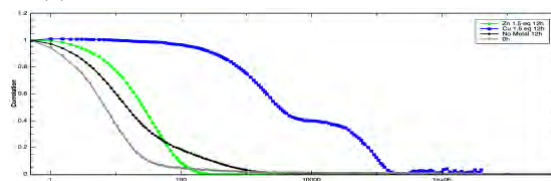


Fig. 3. Correlation curves in DLS before (grey), and after 12 hours in the absence (black) or in the presence of 1.5 equivalents of Cu (II) (blue), or 1.5 equivalents of Zn (II) (green).

Conclusions. The binding process and subsequent aggregation of H γ S were characterized using multiple techniques. Through these analyses, we obtained insights into the mechanism by which Cu (II) and Zn (II) ions induce H γ S aggregation. We found differences in the conformational changes and aggregates induced by these metal ions. These findings provide valuable information for understanding the underlying mechanisms involved.

Acknowledgments. CONAHCYT, LANEM-UAEM for NMR instrumentation. This research was funded by CONACYT A1-S-11842.

Bibliography.

1. Quintanar L., Serebryany E., Domínguez-Calva J. A., Haasse-Pettingell C., and J. A. King. (2015) *Biophys. J.*, vol. 108, no. 2, p. 502a
2. Dominguez-Calva J. A., Perez-Vazquez M. L., Serebryany E., King J. A., and Quintanar L. (2018) *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 23, no. 7, pp. 1105–1118.
3. Ramirez-Bello V., Martinez-Seoane J., Fernandez-Silva A., Amero C. (2022) *Molecules*. 27, 2970.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, CINÉTICA Y TERMODINÁMICA DE LA 3-DEHIDROQUINATO DESHIDRATASA DE *Staphylococcus aureus* resistente A METICILINA

Javier Sebastian Cazares Benitez, Alfredo Téllez Valencia, Jesús Antonio Oria Hernández, Adriana Castillo Villanueva, **Claudia Isela Avitia Domínguez**, FAMEN-UJED, Victoria de Durango 34076, claudia.avitia@ujed.mx

Palabras clave: 3-dehidroquinato deshidratasa, cinética enzimática, caracterización bioquímica.

Introducción. *S. aureus* resistente a metilina (SARM) está relacionado con la adquisición de infecciones a nivel nosocomial, adquiridas en la comunidad y relacionadas con animales de ganado (1). La OMS tiene clasificado a SARM como un patógeno prioritario para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos (2). Dentro de las etapas en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos, se encuentra la identificación y caracterización de blancos moleculares novedosos, en este sentido las enzimas de la ruta shikimato, ausente en humanos, son dianas moleculares interesantes para el desarrollo de fármacos antimicrobianos (3). Dentro de las enzimas de la ruta, se encuentra la 3-dehidroquinato deshidratasa (3-DHGD), que cataliza la deshidratación del 3-dehidroquinato (3-DHQ) a 3-dehidroshikimato. A la fecha esta enzima no se encuentra caracterizada en SARM (4). Por lo tanto, es importante su caracterización como parte del proceso de la búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos.

Objetivo: Caracterizar bioquímica y cinéticamente la 3-dehidroquinato deshidratasa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SaDHGD).

Metodología. El gen *aroD* que codifica para la SaDHGD fue clonado y sobreexpresado en pET-28a usando como fondo genético *E. coli* BL21(DE3). La SaDHGD fue purificada mediante cromatografía de afinidad en una columna de Ni-NTA. Para la medición enzimática, se realizó mediante una modificación a la metodología reportada por Jaafar *et al.* (2021) (5).

Los parámetros cinéticos se obtuvieron a diferentes concentraciones del sustrato (3-DHQ) y ajustándolos al gráfico de Michaelis-Menten.

Para la determinación de los parámetros bioquímicos, se obtuvo la temperatura y pH óptimos variando la temperatura y el pH en su medición, respectivamente. La termoestabilidad y estabilidad al pH se obtuvieron incubando la SaDHGD a diferentes temperaturas y pH, respectivamente. El caso de los parámetros termodinámicos, se calcularon empleando las ecuaciones descritas por Apostolidi *et al.* (2020) (6). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Resultados. Los parámetros cinéticos obtenidos fueron: $V_{\text{máx}} = 107.7 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, $K_M = 53.6 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 48.5 \text{ s}^{-1}$ y eficiencia catalítica = $0.9 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Los estudios funcionales mostraron que la enzima mostraba una actividad máxima a 55°C . Sin embargo, la enzima fue solo estable en temperaturas bajas ($10\text{--}20^\circ\text{C}$) e inactivada por completo a 60°C en 10 min. La SaDHGD mostró conservar su actividad en un rango de pH $7.0\text{--}9.0$ con un pH óptimo de 8.0 e inactivada a pH de 4.0 y 12.0 . También mostró mayor estabilidad conforme el tiempo a pH de 6.0 y 7.0 . De sus parámetros termodinámicos se obtuvo lo siguiente: $E_a = 37.60 \text{ kJ}/\text{mol}$, $E_{\text{denat}} = 116.82 \text{ kJ}/\text{mol}$, $\Delta H_{\text{denat}} = 114.27 \text{ kJ}/\text{mol}$, $\Delta S_{\text{denat}} = 0.0628 \text{ kJ}/\text{mol}\cdot\text{K}$ y ΔG_{denat} a $25^\circ\text{C} = 95.55 \text{ kJ}/\text{mol}$.

Conclusiones.

- Los parámetros cinéticos de la SaDHGD tienen valores en el rango de otras enzimas homólogas a esta.
- La temperatura y pH óptimos de la SaDHGD fueron de 55°C y 8.0 , respectivamente.
- Los análisis de termoestabilidad indican que la enzima tiene un carácter termolábil.
- La SaDHGD se mantiene estable en un rango de pH cercano al neutro.
- La ΔH_{denat} , ΔS_{denat} y ΔG_{denat} demuestran que el proceso de desnaturalización de la enzima es un proceso endotérmico, irreversible y no espontáneo, respectivamente. La E_a y E_{denat} de la enzima demuestran que la enzima requiere mayor cantidad de energía para su inactivación que la requerida para llevar a cabo su catálisis.

Bibliografía.

1. Rasigade, J., & Vandenesch, F. (2014). *Infect Genet Evol*, 21, 510-514.
2. Shrivastava, S., Shrivastava, P., & Ramasamy, J. (2018). *JMS - J Med Soc*, 32(1), 76.
3. Frian, R. (2022). *Antibiotics*, 11(5), 675.
4. De Ávila, M., & de Azevedo W. (2018). *Chem Biol Drug Des*, 92(2), 1468-1474.
5. Jaafar, N., Mahadi, N., Mackeen, M., Illias, R., Murad, A., & Bakar, F. (2021). *J Biotechnol*, 329, 118-127.
6. Apostolidi, M., Kalantzi, S., Hatzinikolaou, D., Kekos, D., & Mamma, D. (2020). *3 Biotech*, 10(7), 311.

El papel de las regiones intrínsecamente desordenadas en la actividad del factor transcripcional RTG1 en la respuesta a estrés hiper-osmótico en levadura

Teresa Beatriz Nava Ramírez & Alejandra A. Covarrubias Robles, Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos C.P. 62210, teresa.nava@ibt.unam.mx, alejandra.covarrubias@ibt.unam.

Palabras clave: Proteínas intrínsecamente desordenadas, factores transcripcionales, estrés ambiental

Introducción. Una alta proporción de factores transcripcionales (FTs) involucrados en la respuesta al estrés ambiental en *Saccharomyces cerevisiae* presentan un elevado nivel de desorden estructural, por lo que se consideran proteínas intrínsecamente desordenadas (PIDs)¹. RTG1 es uno de estos FTs, el cual participa en la señalización de la respuesta a estrés hiperosmótico y nutricional en levadura, a través de la vía retrograda de comunicación entre organelos, contribuyendo así a mantener la homeostasis celular bajo diversas condiciones². RTG1 forma heterodímeros con RTG3, complejo que migra del citoplasma al núcleo cuando se produce daño mitocondrial². Se ha predicho que puede formar biocondensados por separación de fases líquido-líquido¹.

Con la hipótesis de que las propiedades físicoquímicas responsables de la flexibilidad estructural intrínseca de estos FTs están asociadas a su capacidad para detectar cambios en el ambiente intracelular, provocando cambios en su conformación, empleamos a RTG1 para evaluar el papel de sus regiones desordenadas en su actividad para percibir los cambios ambientales.

Metodología. Para detectar cambios conformacionales en RTG1, se generó una proteína quimérica en donde dos proteínas fluorescentes se fusionaron a los extremos de este FT (Cer-RTG1-Cit). Esta proteína se expresó en la levadura bajo un promotor inducible por galactosa, complementando el fenotipo de osmo-sensibilidad de la mutante $\Delta rtg1$. La capacidad de RTG1 para detectar cambios en el medio intracelular se evaluó determinando la señal de la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) entre los dos fluoróforos a diferentes concentraciones de NaCl, KCl, sorbitol y PEG4000. La localización intracelular de este FT se detectó por microscopía de epifluorescencia.

Resultados. RTG1 produce FRET en condiciones de estrés hiperosmótico provocado por NaCl, KCl, sorbitol y PEG4000, indicado que el cambio conformacional reportado por la señal de FRET

responde a una condición hiperosmótica. El análisis de la localización indicó que RTG1 se encuentra en el citosol en condiciones estándar de crecimiento, en tanto que migra al núcleo bajo estrés hiperosmótico, en donde forma biocondensados.

Para determinar si la ganancia de estructura es independiente de la formación del heterodímero con RTG3, la proteína Cer-RTG1-Cit se introdujo en la mutante $\Delta rtg3$, mostrando que aún en ausencia de RTG3 se produce FRET. Al evaluar la localización intracelular de RTG1, se encontró que bajo condiciones estándar éste se localiza mayoritariamente en el citosol, en tanto que, bajo estrés está mayormente en el núcleo y presenta un patrón punteado, sugiriendo la formación de biocondensados de RTG1.

RTG1 se fosforila por Hog1. Para determinar si esta fosforilación se requiere para la generación del cambio conformacional, se evaluó la señal de FRET en una cepa $\Delta hog1$. Ante los cambios osmóticos se detectó de señal FRET, indicando que el cambio conformacional de RTG1 no depende de esta fosforilación.

Conclusiones. Los datos obtenidos indican que el estrés hiperosmótico promueve cambios conformacionales en RTG1, su migración al núcleo en donde presenta un patrón punteado, sugiriendo la formación de biocondensados.

La migración de RTG1 al núcleo y sus cambios conformacionales no dependen de la formación de heterodímeros con RTG3 ni de la fosforilación por Hog1.

Agradecimientos. Este proyecto fue apoyado por CONACyT_FC-2016-2-1615. Teresa B. Nava-Ramírez (CVU 501149) recibió el apoyo de CONACyT a través de una beca postdoctoral.

Bibliografía.

1. French-Pacheco, L., Rosas-Bringas, O., Segovia, L., & Covarrubias, A. A. (2022). PLOS ONE, 17(3), e0265422.
2. Sekito, T., Thornton, J., & Butow, R. A. (2000). Mol Biol Cell 11(6), 2103-2115

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA PRIMERA CICLOGLUCANOTRANSFERASA DE 4 DOMINIOS FABC DEL GÉNERO *Vibrio*

Gabriel Garcia-Laiton¹, Hugo Serrano-Posada^{1,2*}, Sara Centeno-Leija^{1,2*}.

¹Laboratorio de Biología Sintética, Estructural y Molecular – LaBioSEM. ²Investigadores por México - CONACyT, LaBioSEM, Universidad de Colima, Carretera Los Limones-Loma de Juárez, 28629 Colima, Colima, México. *Autores de correspondencia: scenteno0@ucol.mx; hserrano0@ucol.mx.

Palabras clave: α -ciclodextrinas, metabolismo de almidón, dominio F

Introducción. Las cicloglucanotransferasas (CGTasas) catalizan la transglucosilación intramolecular de enlaces α -1,4 del almidón, para generar oligosacáridos cíclicos anfífilos llamados ciclodextrinas (CDs), útiles en aplicaciones biotecnológicas [1]. La asimilación de carbohidratos vía ciclodextrinas funcionales (CM-CD) es una ruta microbiana poco común, útil para supervivencia en entornos extremófilos [2]. La arquitectura global de las CGTasas se compone de un barril TIM catalítico (dominios AB), seguido de tres dominios β -sándwich (-CDE), que influyen en la unión al sustrato y especificidad [3]. Esta configuración de cinco dominios ABCDE es la única estructura de las CGTasas que se conoce. Recientemente, nuestro Grupo de Investigación detectó mediante minería de datos de (meta)genomas, un nuevo grupo de CGTasas de 3 dominios ABC [2], así como un grupo exclusivo de CGTasas del género *Vibrio*. Estas últimas presentan una estructura atípica de 4 dominios FABC, en donde el dominio F es un β -sándwich de función desconocida ubicado en el extremo N-terminal [4].

Este trabajo presenta la caracterización bioquímica, funcional y estructural de la CGTasa recombinante de *Vibrio sinaloensis* (VsIA), siendo el primer representante del nuevo grupo FABC.

Metodología. Predicción de la estructura tridimensional y análisis: AlphaFold2, YASARA, Coot, CCP4mg y USCF Chimera. Gen sintético: *pET22b::VsIA* (Integrated DNA Technologies). Hospedero: *E. coli* SHuffleT7. Medio de producción: LB y YT2X. Inducción: IPTG. Purificación: cromatografía por afinidad a níquel y de exclusión molecular (SEC). Medición de actividad global: método de DNS. HPLC: columna Amida (X-Bridge® BEH Amide, 5 μ m, 4.6x150 mm; Waters) en fase reversa acetonitrilo:agua 65:35.

Resultados.

1. Purificación de VsIA.

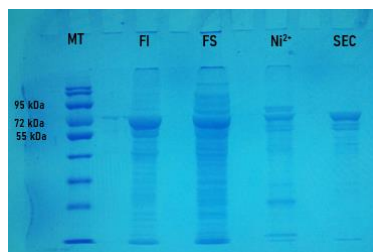


Fig. 1. Gel SDS-PAGE al 12%. Note a VsIA purificada por SEC con peso molecular de ~68.6 kDa en el último carril.

2. Estructura tridimensional.

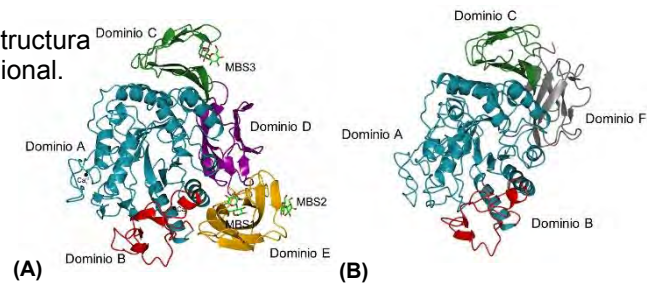


Fig. 2. (A) Estructura de una CGTasa de cinco dominios ABCDE (Código PDB 1CDG). (B) Modelo tridimensional de VsIA obtenido con AlphaFold. Note que el dominio F se ubica espacialmente en una región similar a los dominios -DE de las CGTasas clásicas.

3. Análisis estructural y de productos por HPLC.

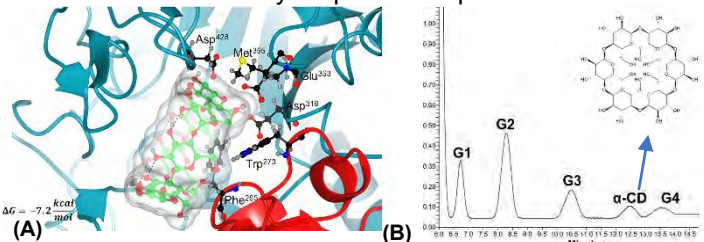


Fig. 3. (A) Simulación de acoplamiento molecular con α -CD en el sitio activo de VsIA. Note los aminoácidos involucrados en la catálisis Phe²⁸⁵, Met²⁵⁵, Trp²⁷³, Asp³¹⁹, Glu³⁵³ y Asp⁴²⁸. (B) Cromatograma de los productos generados por VsIA (pH 7.0, 5% almidón, T = 35 °C, t = 24 h). Actividad específica de VsIA: 54 U/mg a 70 °C.

Conclusiones. Se demuestra la función CGTasa nunca antes reportada para el género *Vibrio*, lo que sugiere un papel fisiológico relacionado con la ruta CM-CD en este microorganismo patógeno. Además, se confirma la existencia de un nuevo grupo de CGTasas con una configuración atípica de 4 dominios FABC, cuyo dominio F podría presentar una función similar a los dominios clásicos β -sándwich CBM20, que incluyen los motivos MBS1 y MBS2. VsIA es un nuevo biocatalizador útil para fines biotecnológicos, capaz de generar productos de alto valor agregado como α -CDs, a partir de un sustrato económico como el almidón.

Agradecimiento. GGL cuenta con el apoyo de la beca CONACyT No. 826937. HSP y SCL agradecen el apoyo de los proyectos CONACyT CB-2018-A1-S-18011, CF-2019-33-549477, INFR-2021-17-316456.

Bibliografía.

- [1]. Uitdehaag, J. C. M., et al. (1999). Journal of Biological Chemistry, 274(49), 34868–34876. [2] Centeno-Leija, S., et al. (2022). Scientific Reports, 12(1), 1–16. [3] Lawson, C. L., et al. (1994). Journal of Molecular Biology, 236(2), 590–600. [4] Romero-Jiménez, M. (2023). Universidad de Colima. Tesis de Maestría.

INTEGRACIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES Y MÉTODOS COMPUTACIONALES PARA AYUDAR Y ENRIQUECER LA INTERPRETACIÓN.

Hariel Gaytan Reyes, Reinier Cárdenas, Carlos Amero.

Laboratorio de Bioquímica y Resonancia Magnética Nuclear, Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62200.

hariel.gaytanrey@uaem.edu.mx

Palabras clave: Biología estructural, técnicas experimentales, métodos computacionales

Introducción. Uno de los principales objetivos de la biología estructural es estudiar la función de las biomoléculas. Sin embargo, estas moléculas, no son solo estructuras estáticas, sino más bien son sistemas dinámicos que cambian de conformación, interaccionan, realizan reacciones y responden a diferentes estímulos, con lo cual, la obtención de una interpretación estructural detallada de los resultados experimentales suele ser una tarea complicada. Si bien los métodos experimentales y computacionales a menudo se consideran dos enfoques diferentes y separados, el poder y la utilidad de combinar ambos es innegable.

En el LABRMN estamos trabajando para integrar datos experimentales con técnicas computacionales para ayudar y enriquecer la interpretación y, así poder obtener una comprensión más detallada de los sistemas.

Metodología. En la integración de estas dos metodologías es necesario poder interpretar los resultados experimentales como una variable biofísica (parámetro estructural) y, al mismo tiempo, poder calcular la misma variable a partir de un modelo tridimensional¹.

Investigamos diferentes maneras de interpretar y calcular datos experimentales, para posteriormente, utilizar protocolos de búsqueda y selección. En estos protocolos, por medio de métodos computacionales se generan una gran cantidad de moléculas con conformaciones diferentes y luego los datos experimentales se utilizan para filtrar, seleccionando únicamente las conformaciones que describan el sistema².

Resultados. Algunos de los métodos experimentales más utilizados para estudiar las transiciones estructurales, el plegamiento, la dinámica y la oligomerización de las biomoléculas son la Resonancia Magnética

Nuclear (RMN), la fluorescencia y la Dispersión Dinámica de luz (DLS), entre otros.

Específicamente estamos estudiando la integración del desplazamiento químico de la cadena principal (RMN), de la fluorescencia del triptófano y la cuantificación de la dispersión de señales (DLS).

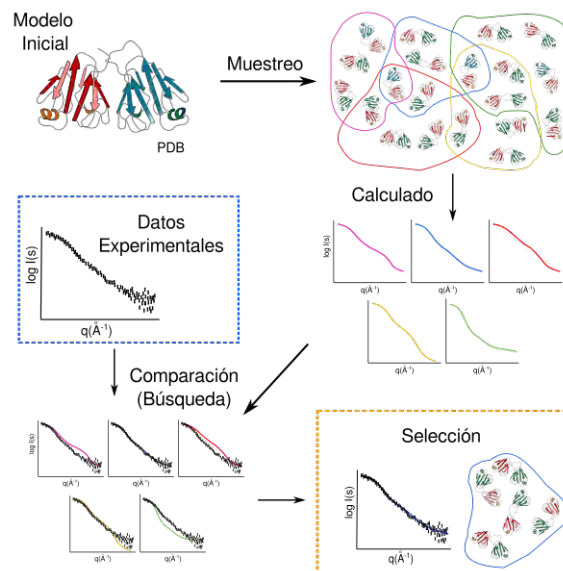


Fig. 1. Representación esquemática de los diferentes pasos en el enfoque de búsqueda y selección.

Conclusiones. La capacidad de reproducción de los datos experimentales utilizando métodos computacionales proporciona una descripción atómica detallada a la que no se podía acceder únicamente con los datos experimentales.

Bibliografía.

1. Bottaro, S., Bengtsen, T., Lindorff-Larsen, (2020) *Methods Mol. Biol.* 2020, 2112, 219–240.
2. Cardenas R., Martinez-Seoane J., Amero C.,(2020), *Molecules*, 25 (20), 4783. Doi:10.3390/molecules25204783

Caracterización fisicoquímica de triosafosfato isomerasas ancestrales obtenidas mediante diferentes métodos de reconstrucción.

Pérez-Niño, Jorge Alejandro¹; Guerra Borrego, Yasel^{2,3}; Rodríguez Romero, Adela³; Díaz Salazar, Alma Jessica⁵; Costas Basin, Miguel⁵; Fernández-Velasco, D. Alejandro¹.

1 Laboratorio de Fisiología e Ingeniería de Proteínas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México; CDMX, México. 2 Ingeniería en Biotecnología, Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Universidad de Las Américas, Quito, Ecuador. 3 Grupo de Bio-Quimioinformática, Universidad de Las Américas, Quito, Ecuador. 4 Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México. 5 Facultad de Medicina; Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

La reconstrucción de secuencias ancestrales (ASR) utiliza información filogenética y modelos evolutivos para inferir las secuencias de proteínas ancestrales que luego se sintetizan, expresan y caracterizan en el laboratorio. La ASR se ha utilizado para estudiar la evolución de varias facetas de las proteínas. Los métodos utilizados en la ASR son probabilísticos, por lo que existe ambigüedad en la identidad de aminoácidos de las secuencias inferidas. La robustez del fenotipo ante la incertidumbre del proceso de reconstrucción es, por tanto, central para la validez de las conclusiones obtenidas por ASR.

En este trabajo utilizamos ASR para estudiar la evolución de la enzima glucolítica triosafosfato isomerasa (TIM). Las TIM eucariotas son homodímeros altamente activos, cuyos monómeros son inactivos e inestables. En este trabajo estudiamos la función, estabilidad y estructura de la TIM del último ancestro común del linaje opistoconta. Para determinar la robustez de estas características frente a las incertidumbres asociadas a la ASR, se caracterizaron experimentalmente las secuencias obtenidas mediante dos métodos, máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana, así como la secuencia del “peor caso posible” para cada uno de ellos.

Las cuatro TIM ancestrales reconstruidas fueron diméricas, mostraron una eficiencia catalítica limitada por difusión y una firma termodinámica similar para la unión de ligandos. Las estructuras cristalográficas de las cuatro proteínas son muy similares, sin embargo, se encontraron diferencias en las hélices, así como en el número y extensión de los cúmulos hidrofóbicos. Los experimentos de desplegamiento inducidos por urea indican que las TIM ancestrales reconstruidas por ambos métodos muestran monómeros inactivos que, sin embargo, son significativamente más estables que los de las TIM actuales. Se ha sugerido que, dado que la TIM es activa sólo como dímero, no existe una presión selectiva para que los monómeros sean estables. Nuestros resultados sugieren que cuando apareció el linaje opistoconta, la actividad catalítica ya estaba ausente de los monómeros TIM, pero la estabilidad conformacional no se había erosionado. En contraste, observamos que la termoestabilidad de las TIMs ancestrales depende del método de reconstrucción, las TIM inferidas por el método ML mostraron una temperatura de desplegamiento 10°C mayor que las obtenidos por inferencia bayesiana. Esto indica que las propiedades funcionales y estructurales de la TIM son más robustas que la estabilidad térmica.

Apoyado por Facultad de Medicina UNAM, CONACYT y PAPIIT-UNAM IV200322 e IN218222.

ESTUDIOS SOBRE LA DIVERGENCIA CINÉTICA Y ESTRUCTURAL DE LAS NITRILASAS

Eréndira Rojas Ortega, Eugenia Flores Robles y Georgina Garza-Ramos. LFQIP, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, 04510, ggarza@bq.unam.mx.

Palabras clave: biocatálisis, enzimología, estructura de proteínas

Introducción. Las nitrilasas catalizan la hidrólisis de nitrilos orgánicos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, liberando amonio, y se encuentran en plantas, hongos y bacterias (1). La superposición estructural entre nitrilasas y sus homólogos distantes, muestran una coordinación estructural casi idéntica de las tríadas catalíticas, y diferencias significativas en las cavidades de unión al sustrato, siendo éstas, determinantes en la especificidad por el sustrato (2). La oligomerización en las nitrilasas es un prerrequisito indispensable para su actividad enzimática. Se ensamblan en espirales cortas de 12 a 22 subunidades o en filamentos helicoidales de tamaño variable (50-400 nm) (1). Se ha propuesto que la especificidad del sustrato también podría estar relacionada con las características estructurales del ensamble oligomérico, en particular con el tamaño del giro helicoidal (3).

En este trabajo usando como modelo experimental a las nitrilasas AtNit2 y AtNit4 de *Arabidopsis thaliana*, se intercambiaron de manera racional, regiones estructurales asociadas a la cavidad catalítica que se propone, determinan las diferencias en la especificidad entre ambas isoenzimas: AtNit4 es específica para β -ciano alanina y AtNit2 para nitrilos alifáticos, con preferencia por el fenilpropionitrilo.

Metodología. Las secuencias de los genes nativos y de las mutantes quiméricas se optimizaron para su expresión en *E. coli*. Las proteínas se purificaron por afinidad a Ni^{2+} , para los ensayos de actividad se determinó el amonio liberado en la reacción. La caracterización estructural se realizó por DC, DLS y TEM. Con AlphaFold (4) se generaron los modelos por homología de los tetrámeros de AtNit2 y de las quimeras, los dodécmeros se construyeron en Modeller usando como templado la estructura del filamento de AtNit4. Se realizaron dinámicas moleculares (50 ns) en el programa AMBER. Los análisis de cavidades y túneles se realizaron con Caver Analyst y de redes de interacción con RING 3.0 (5).

Resultados. Mediante alineamientos estructurales y de secuencias homólogas se determinaron las regiones conservadas entre las AtNit1-3 y las variables en AtNit4. Se seleccionaron las diferencias encontradas alrededor de la cavidad catalítica y del carboxilo terminal, a partir de las cuales se diseñaron, purificaron y caracterizaron, cinco quimeras de AtNIT2/AtNIT4:

Tabla 1. Parámetros cinéticos, valores aparentes de Tm y los diámetros promedio de las nitrilasas quiméricas.

| | PPN | | (CN)Ala | | DC | DLS |
|---------|------------|------------------------------|------------|------------------------------|----------------------|---------------------|
| | K_m (mM) | k_{cat} (s ⁻¹) | K_m (mM) | k_{cat} (s ⁻¹) | T _m ap °C | D _H (nm) |
| AtNit2 | 0.1 | 18.5 | nd | nd | 55 | 16.5±2 |
| AtNit4 | 4.9 | 0.16 | 0.18 | 7.5 | 54 | 101±5 |
| F196Q | 3.5 | 0.33 | 0.36 | 10.09 | 55 | 111±10 |
| 222-224 | 3.9 | 0.31 | 0.78 | 1.8 | 65 | 37±9 |
| CX1 | 6.1 | 0.74 | 0.59 | 20.3 | 68 | 93.5±11 |
| CX2 | 4.7 | 1.0 | 0.42 | 16.5 | 69 | 88±10 |
| Loop | nd | nd | nd | nd | 67 | 21.7±4 |

Los valores obtenidos son promedio de al menos 3 experimentos distintos

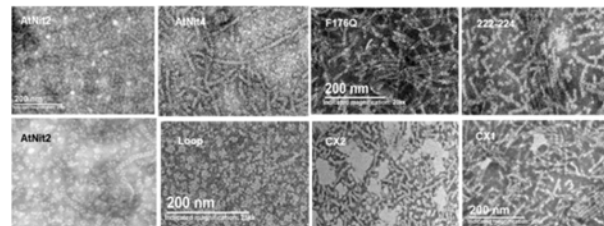


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica con tinción negativa de las nitrilasas quiméricas.

Los análisis *in silico*, a partir de los modelos estructurales generados, de las nitrilasas silvestres y quiméricas, indican cambios significativos en el volumen de la cavidad y del túnel principal de entrada del sustrato, así como diferencias en las redes de interacciones a través de las interfaces.

Conclusiones. El intercambio de regiones de AtNit2 en la AtNit4 induce un aumento en la termoestabilidad ($\delta T_m=15^\circ C$), y cambios pequeños en la especificidad por sustrato. Los resultados sugieren una dependencia de la topología de la cavidad catalítica sobre el ensamblaje entre las subunidades del oligómero.

Agradecimiento. DGAPA-UNAM: PAPIIT IN218318. CONAHCYT: A1-S-7853.

Bibliografía. (1) Thuku, R.N., Brady, D., Benedik, M.J., y Sewell, B.T. (2009) *J. App. Microbiol.* 106(3), 703-727. (2) Mulelu, A.E., Kirykovicz, A.M. y Woodward J.D. (2019) *Commun Biol* 2, 260. (3) Woodward, J.D, Trompetter I., Sewell B.T., Piotrowski M. (2018) *Commun Biol* 1, 189. (4) Jumper, J. et al. (2021) *Nature* 596, 583-589. (5) Clementel, D., del Conte, A., Monzon, A.M., Camagni, G.F., Minervini, G., Piovesan, D., Tosatto, S.C.E. (2022) *Nucl Acids Res* 50(1), 651-656.



Proteínas

EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE Ami1 Y CwIM DE *M. tuberculosis*.

Sharo Rosas^a, Patricia Cano^b & Siseth Martínez-Caballero^a.

^aLaboratorio de Biomacromoléculas 1, Instituto de Química, UNAM, CDMX, 04510.

^bLaboratorio de Biología Molecular, Instituto de Química, UNAM, CDMX, 04510.

maciel2903sharo@gmail.com

Palabras clave: *M. tuberculosis*, peptidoglicano, amidasas.

Introducción. La tuberculosis es la infección letal número uno a nivel mundial, causada por el patógeno *M. tuberculosis* (*Mtb*). En el año 2016 esta bacteria fue incluida por la OMS como prioritaria en el combate a la resistencia bacteriana (1). Un blanco interesante para el desarrollo de nuevos fármacos son las enzimas involucradas en la síntesis y reciclaje de la pared celular. La hidrólisis del PG es llevada a cabo por un grupo de enzimas que en su conjunto son capaces de digerir este polímero en fragmentos solubles y se dividen en tres clases: amidasas, peptidasas y glicosidasas. Las amidasas hidrolizan la unión entre el NAM y el residuo L-alanina y están involucradas en diversos procesos celulares además de estar relacionadas con la resistencia a los antibióticos (2). El objetivo de este trabajo fue la expresión y caracterización de las amidasas Ami1 y CwIM, lo que nos permitirá sustentar las bases para identificación de nuevos blancos y sus mecanismos de acción.

Metodología. En este trabajo se realizó la expresión de ambas proteínas usando como sistema heterólogo a *E. coli*. Ami1 se purificó por cromatografía de afinidad a níquel y CwIM fue solubilizada con urea para su posterior replegamiento *in vitro*. Además, se caracterizaron mediante la evaluación de su contenido de estructura secundaria y actividad enzimática.

Resultados. Posterior al replegamiento *in vitro* se evaluó la presencia de contenido de estructura secundaria de CwIM en presencia y ausencia de zinc (cofactor); en ambas condiciones nosotros observamos la presencia de dos mínimos a 208 y 222 nm característicos de proteínas con alto contenido en hélices alfa (Fig. 1). Además, para Ami1 obtuvimos cristales de proteína, lo cual es indicativo de su correcto plegamiento tridimensional.

Para ambas proteínas realizamos la evaluación de la actividad enzimática mediante un zimograma (Fig. 2). Tal como esperábamos Ami1 presentó actividad. Sin embargo, CwIM a pesar de presentar contenido de estructura secundaria fue inactiva lo cual nos indica

que la proteína no tiene un correcto plegamiento tridimensional.

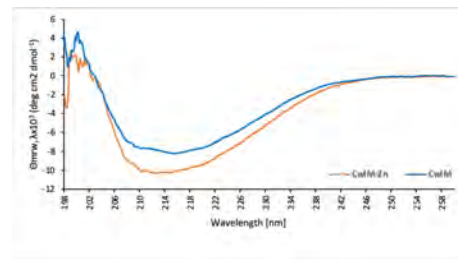


Fig 1. Espectros de Dicroísmo Circular obtenidos en el UV-lejano de CwIM.

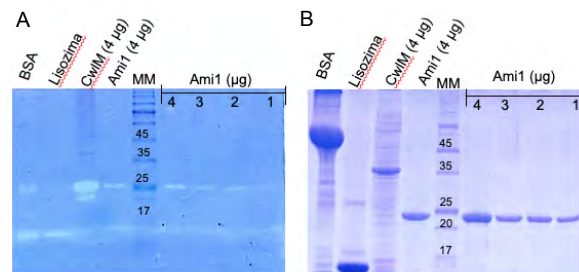


Fig 2. A) Zimograma usando pared celular de bacterias muertas como sustrato. Como control negativo se usó suero de albumina bovina (BSA) y lisozima como control positivo. B) SDS-PAGE al 12% como control de las proteínas evaluadas en el zimograma.

Conclusiones. Se logró obtener Ami1 de forma soluble y con actividad enzimática. Sin embargo, aunque CwIM presentó contenido de estructura secundaria después del replegamiento *in vitro* no fue activa.

Agradecimientos. Este trabajo fue llevado a cabo gracias a los financiamientos obtenidos por CONAHCYT 319596 y PAPIIT IA20512

Bibliografía.

1. WHO (2017) https://www.who.int/medicines/areas/retional_use/PPLreport_2017_09_19.pdf?ua=1
2. Maitra A, Munshi T, Healy J, et al. (2019) Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles'heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiol Rev.* 43:548-575.

CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS AMIDASAS 3 Y 4 DE *M. tuberculosis*.

Paola Montero & Siseth Martínez-Caballero

Depto. Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, UNAM, CDMX, 04510.

paola.montero@cua.uam.mx

Palabras clave: *M. tuberculosis*, peptidoglicano y amidasas.

Introducción. La tuberculosis es una enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, la cual infecta principalmente a los pulmones. Actualmente, el mayor problema para combatir la tuberculosis es la aparición de cepas fármaco resistentes y multi-fármaco resistentes (1). Uno de los principales blancos farmacológicos es la pared celular de las bacterias. En *Mycobacterium* está es una estructura compleja, constituida principalmente por 3 componentes: ácidos micólicos, arabinogalactano y peptidoglicano (PG). Este último es un polímero formado por cadenas glicánicas de unidades alternantes de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilmurámico (MurNAc) unidos por enlaces β (1 \rightarrow 4). A su vez, los residuos de MurNAc, se unen a un tetra- o penta-péptido que forma enlace con el péptido de otra cadena glicánica.

En *M. tuberculosis* se han reportado cuatro homólogos de amidasas; las cuales se han clasificado en dos familias: amidasa₂, familia donde se agrupa Ami3; Rv3811 y Ami4; Rv3594 y la familia amidasa₃ dependiente de zinc a la cual pertenecen Ami1; Rv3717 y Ami2; Rv3915 (2). Debido al importante papel que desempeñan estas proteínas en diversos procesos celulares como el reciclaje del PG es importante un estudio bioquímico y estructural el cual pueda sustentar las bases para identificación de nuevos blancos y sus mecanismos de acción.

En este trabajo nos hemos centrado en la clonación, expresión y purificación de las dos amidasas pertenecientes a la familia amidasa₂ de *M. tuberculosis*.

Metodología. Se realizó la amplificación del gen Rv3594 y Rv3811 a partir del ADN genómico de *M. tuberculosis* usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se clonaron en el plásmido pCS157. Posteriormente se hicieron las pruebas de expresión usando diferentes cepas de *E. coli*. Finalmente la purificación se realizó por medio de una cromatografía de afinidad a níquel.

Resultados. Se llevó a cabo la expresión heteróloga de Ami3 y Ami4, las cuales se obtuvieron solubles en las cepas BL21 DE3 pLysSs y C41 respectivamente (Fig. 1).

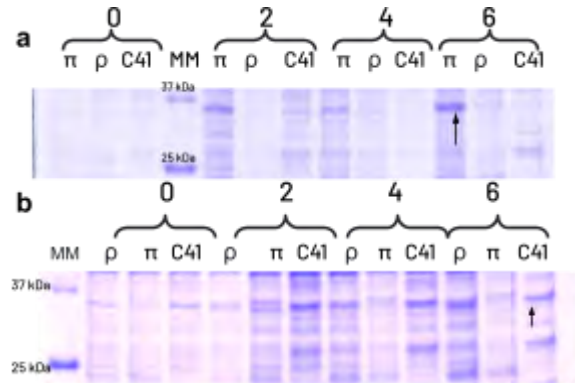


Figura 1. Cinética de expresión en 3 diferentes cepas de *E. coli*: Rosetta DE3 (ρ), BL21 DE3 pLysS (π) y C41 en la fracción soluble. a) Ami3, se expresó en mayor cantidad a las 6 horas en la cepa π ; b) Ami4, la mayor expresión se observó en C41 a las 6 horas.

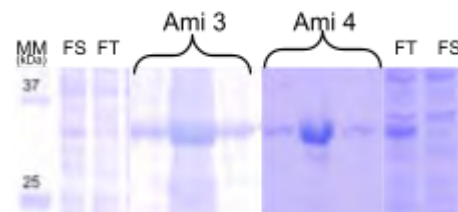
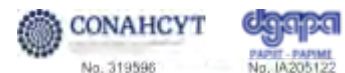


Figura 2. Gel SDS-PAGE al 12% de la purificación por afinidad a níquel de Ami3 (33.3 kDa) y Ami 4 (33.4 kDa); FS representa la Fracción Soluble y FT el Flow Through.

Conclusiones. Se logró la expresión soluble de las amidasas 3 y 4 en las cepas BL21 DE3 pLysS (π) y C41 respectivamente. Además se logró su purificación por cromatografía de afinidad a níquel. Estos resultados son importantes ya que nos permitirán realizar su caracterización bioquímica, biofísica y estructural.

Agradecimientos.



Bibliografía.

1. WHO.(2021). <https://acortar.link/Ar2Cse>
2. Machowski EE, Senzani S, Ealand C, et al. (2014) BMC Microbiol. 14:75

METALOTIONEÍNAS EN BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS MINEROS Y SU USO EN LA RECUPERACIÓN DE METALES DE VALOR COMERCIAL

Salomón Alvarado-Cardona, Mayra Avelar, Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioenergética, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, 98160. 20202098@uaz.edu.mx.

Palabras clave: metales, biorremediación, biominería.

Introducción. Las metalotioneínas constituyen una superfamilia de proteínas citosólicas, de bajo peso molecular, aunque hay sus excepciones (1). Éstas son capaces de “quelar” metales pesados a través de sus numerosos residuos de cisteína, cuyos grupos tiol o sulfhidrilo, que son muy reactivos, presentan una gran afinidad por los cationes metálicos, a los que pueden unirse formando complejos metal-tiolato. *Tetrahymena thermophila* es un ciliado unicelular muy conocido y usado en biotecnología por su fácil manipulación genética y de cultivo. En este ciliado existen 5 isoformas de metalotioneínas (Tabla 1) que destacan por su excepcional longitud y capacidad de quelación de iones metálicos, misma que depende en gran medida de la cantidad de residuos de cisteína presentes en la proteína (2).

Tabla 1. Isoformas de Metalotioneínas de *T. Thermophila* (Tabla modificada de [2])

| MT | Longitud (aa) | Peso Molecular (KDa) | Cys totales | % Cys | Capacidad real y (teórica) de quelación |
|------|---------------|----------------------|-------------|-------|---|
| MTT1 | 162 | 16.7 | 48 | 29.6 | 17 (17) Cd ²⁺ |
| MTT3 | 162 | 17.3 | 42 | 25.9 | (15) Cd ²⁺ |
| MTT5 | 99 | 10.9 | 24 | 24.2 | 8 (8) Cd ²⁺ |
| MTT2 | 108 | 11.1 | 32 | 29.6 | 20 (19) Cu ⁺ |
| MTT4 | 108 | 11.2 | 32 | 29.6 | 20 (19) Cu ⁺ |

Además del estudio y conocimiento de proteínas con potencial capacidad de uso en la biorremediación, la intención de esta investigación es aportar herramientas e ideas para la innovación en el área de la biominería, dejando implícito la importancia de obtener un beneficio, además del ambiental, de los procesos de biorremediación.

Metodología. Para la realización de esta revisión bibliográfica se llevó a cabo una búsqueda en revistas científicas y libros sobre la biorremediación, abarcando temas como suelos mineros o contaminados con metales pesados y haciendo especial atención a los referentes a la recuperación de metales de valor comercial.

Resultados. Derivado del objetivo del presente trabajo, se pudiese hablar de las siguientes aportaciones e ideas:

i) La capacidad de las metalotioneínas de quelar iones metálicos pone en evidencia su posible uso como biosensores para la detección de contaminación por

metales pesados, ya sea en cuerpos de agua o suelos, principalmente. Esto pudiera lograrse con la inmovilización de estas proteínas en matrices sencillas que, homólogo a como sucede en una prueba de embarazo comercial, los iones metálicos se unan a las proteínas inmovilizadas, creando una línea de indicación positiva a la presencia de estos iones en altas concentraciones. Esto se ha aplicado con células enteras añadiéndose indicadores colorimétricos o fluorescentes (3); sin embargo, el crecimiento de las células y la adaptación de éstas impiden que el método sea, en sí, rápido.

ii) Su uso en biorreactores para la biorremediación de aguas o efluentes contaminados con metales pesados. Esto se ha hecho con microalgas inmovilizadas que, en esencia, usan el principio de las metalotioneínas, al depositarlas en las vacuolas de las microalgas (4). Añadido a esto, las metalotioneínas pueden actuar como “selectoras” de iones metálicos, separando los metales que son de interés, como el cobre, por el cual tienen afinidad, de otros metales que no tienen algún uso o valor directo. Con ingeniería de proteínas, usando evolución dirigida y comparando, tal vez, la capacidad de otras proteínas capaces de quelar otro tipo de metales, se podría inducir una mutación que conceda a las metalotioneínas la capacidad de quelación de estos metales diversos.

Conclusiones. Las metalotioneínas son proteínas con un potencial aprovechamiento que, ahora y en el futuro, tiene increíbles oportunidades en el área de biorremediación y biominería, aunque su crecimiento depende del avance y el interés, tanto del mundo científico como de las empresas.

Agradecimiento. Los autores agradecen al LSAYB de la UAZ por la infraestructura y facilidades para la realización de este trabajo. MA agradece la beca posdoctoral del CONAHCYT, 364335.

Bibliografía.

1. Beltrán-Pineda, M.E., Gómez-Rodríguez, A.M., (2016) Facultad de Ciencias Básicas, UMG. 12 (2): 172 – 197.
2. Francisco, P., (2017). “Metalotioneínas de *Tetrahymena*...”. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
3. Gutiérrez, J. C., Martín-González, A., Díaz, S. & Ortega, R. (2003) *Eur. J. Protistol.*, 39(4): 461–467.
4. Salam K.A. *Biofuel Res. J.* 22 (2019): 948-961.

INTERACCIÓN ENTRE NAFTALENDIIMIDAS Y ÁCIDOS NAFTÓICOS CON ARGININA CINASA DE *Rhipicephalus Sanguineus*

José Félix Rojas Cabeza¹, Adrián Ochoa Terán², Rosa Elena Navarro-Gautrín³, Karina D. García Orozco¹, Rogerio R. Sotelo Mundo^{1,*}

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Lab. de Estructura Biomolecular, Hermosillo, Sonora, Mexico, 83304. (rrs@ciad.mx)

² Tecnológico Nacional de México - Instituto Tecnológico de Tijuana, Centro de Graduados e investigación en Química, Tijuana, BC, Mexico, 22454.

³ Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico, 83000.

Palabras clave: Arginina Cinasa, Acoplamiento Molecular, Espectroscopía de Fluorescencia y UV

Introducción. El control de Ixódidos es un problema mundial que ocasiona daños humanos y materiales. De las enfermedades transmitidas por estos vectores, las más estudiadas son la enfermedad de Lyme y la fiebre manchada. El uso de acaricidas por períodos prolongados promueve el desarrollo de resistencia, por lo que deben proponerse nuevas estrategias de control. Una oportunidad para el desarrollo de nuevos acaricidas es la inhibición del sistema fosfágeno, que aporta energía de reserva en situaciones de estrés. Se pretende caracterizar la inhibición de la arginina cinasa de *R. sanguineus* (RsAK) con compuestos sintéticos de tipo naftalendiimida (NDI), ácidos naftóicos y carbamoil carboxílicos, para aportar información sobre el funcionamiento de la enzima, predecir su comportamiento y contribuir al eventual desarrollo de nuevas estrategias de control de estos invertebrados. Investigaremos la inhibición enzimática mediante el modelaje de acoplamiento molecular, espectroscopía de fluorescencia y UV.

Metodología. Se utilizó autodock vina 1.2 para realizar acoplamiento molecular rígido en una biblioteca de 52 NDI, 28 compuestos naturales reportados como inhibidores de AK o con efecto sobre *R. sanguineus* y 6 ácidos carbamoil-carboxílicos (ACB), sintetizados en el grupo del Dr. Adrián Ochoa-Terán (1), para analizar su interacción con RsAK por fluorescencia y UV.

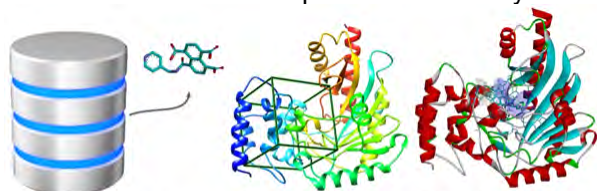


Fig. 1. Esquema general de los métodos de Acoplamiento molecular utilizados.

La arginina cinasa se purificará con el método descrito por Gomez Yanez *et al.*, (2). Se investigarán

interacciones entre las moléculas pequeñas y RsAK utilizando opacamiento de la fluorescencia de triptófano y ensayos de actividad enzimática.

Resultados. De acuerdo con los resultados del acoplamiento se seleccionaron dos ácidos carbamoil carboxílicos (ACB1, ACB6), dos ácidos naftóicos (4g y 4a), y tres naftalendiimidas (2e, 1g, 1h).

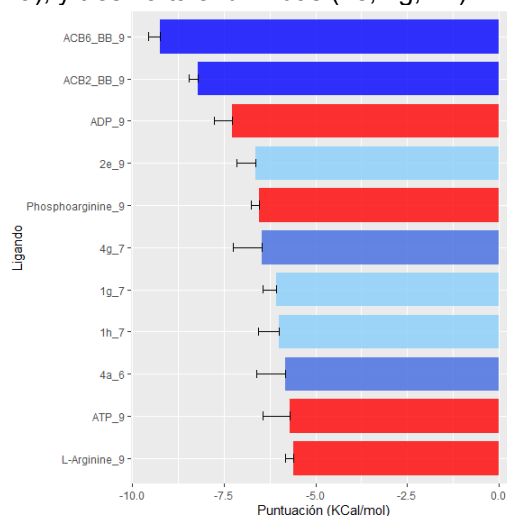


Fig. 2. Puntuaciones de acoplamiento molecular de RsAK y los compuestos analizados y los sustratos. Los ACBs se muestran en Azul oscuro, los ácidos naftóicos en azul medio, y las NDIs en azul claro.

Conclusiones. Se espera encontrar experimentalmente las interacciones entre los compuestos seleccionados y RsAK como se predice computacionalmente

Agradecimiento. Agradecemos a CONAHCYT (proyecto CB-2019-241-610264) y a CIAD por el financiamiento.

Bibliografía.

- Alatorre-Barajas JA, Ramírez-Zatarain SD, Ochoa-Terán A, Cordova J, Reynoso-Soto EA, Chávez D, et al. *ChemistrySelect*. 2018 Nov 15;3(42):11943–9.
- Gomez-Yanes AC, Moreno-Cordova EN, Garcia-Orozco KD, Laino A, Islas-Osuna MA, Lopez-Zavala AA, et al. *Catalysts*. 2022 Oct 6;12(10):1178.

“INHIBICIÓN DE LA PTP1B. OBTENCIÓN DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS PARA EL DISEÑO DE UN NUEVO FÁRMACO PARA LA DIABETES TIPO 2.”

Ana Karina Segovia Parra, Claudia Isela Avitia Domínguez, Jorge Cisneros Martínez, **Alfredo Téllez Valencia**, Facultad de Medicina y Nutrición, Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, Dgo. 34000, atellez@ujed.mx

Palabras clave: PTP1B, derivados de benzimidazol, diabetes tipo 2.

Introducción. La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) participa como regulador negativo de la vía de señalización de la insulina, desfosforilando el receptor de insulina y el sustrato receptor de insulina, reduciendo la sensibilidad y desactivando la señalización de la vía (1)(2). Es por ello que la PTP1B es considerada un blanco terapéutico atractivo para el diseño de un nuevo fármaco para el tratamiento de la diabetes tipo 2(3). En la actualidad existen alternativas de diversos fármacos para el tratamiento de la DM2 sin embargo a largo plazo muestran una eficacia limitada, siendo incapaces de mantener el control glucémico durante años, es por eso la importancia de nuevas alternativas para el tratamiento de la DM2(4). **Objetivo.** Caracterizar cinética y estructuralmente inhibidores de la PTP1B, los cuales puedan servir como guías para el diseño de un nuevo fármaco contra la diabetes mellitus tipo 2.

Metodología. La obtención de inhibidores se llevó a cabo mediante el estudio de una quimioteca de 109 derivados de benzimidazol. El mecanismo de inhibición de los compuestos más potentes se llevó a cabo mediante curvas a una concentración fija del compuesto variando la concentración del sustrato. El acoplamiento molecular se llevó a cabo con Autodock Vina 4, los complejos PTP1B-inhibidor con el mejor puntaje de acoplamiento fueron seleccionados para las simulaciones de dinámica molecular. Finalmente, la predicción de los parámetros ADMETox de los inhibidores, se llevó a cabo mediante los servidores SwissADME y Data Warrior.

Resultados. La caracterización cinética de los cuatro compuestos con mayor capacidad de inhibición (**LTCN6**, **LTCN7**, **LTCN8** y **FBZ**) mostró que todos fueron inhibidores de tipo no-competitivo (Tabla 1). Por otro lado, los estudios de dinámica molecular (Fig.1) indicaron que los compuestos interactuaron con aminoácidos del sitio secundario de unión a fosfato, lo cual sugiere que potencialmente pueden ser selectivos con respecto a otras fosfatasas. El análisis *in silico* de propiedades ADMETox sugirió que los inhibidores cumplen, en general, desde el punto de su estructura

química, con los parámetros para ser considerados candidatos a fármacos.

Tabla 1. Parámetros cinéticos para cada uno de los inhibidores.

| Molécula | K_i (μM) | $V_{m\acute{a}x}$ (mmol/min/mg) | K_m (mM) | Tipo de Inhibición |
|----------|-------------------------|---------------------------------|------------|--------------------|
| FBZ | 32.4 | 0.8487 | 2.3 | No competitiva |
| LTCN6 | 19.4 | 0.8367 | 2.2 | No competitiva |
| LTCN7 | 10.9 | 0.8347 | 2.2 | No competitiva |
| LTCN8 | 13.9 | 0.8556 | 2.4 | No competitiva |

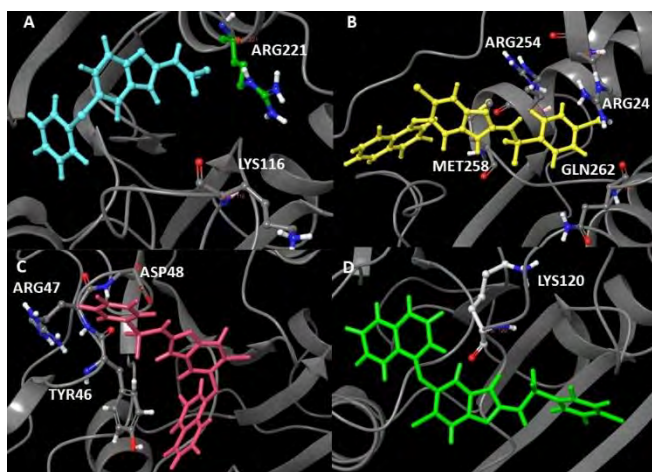


Fig. 1. Interacción con residuos en la PTP1B de los compuestos: (A) FBZ (B) LTCN6 (C) LTCN7 y (D) LTCN8 en la PTP1B.

Conclusiones. El presente trabajo aportó 4 nuevos inhibidores de la PTP1B, los cuales coadyuvan en el proceso del diseño de un nuevo fármaco contra la DM2.

Bibliografía.

1. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, et al. (1999) *Science*. 283(5407):1544-1548.
2. Zhang ZY, Dodd GT, Tiganis T. (2015) *Trends Pharmacol Sci*. 36(10):661-674.
3. Qian S, Zhang M, He Y, Wang W. (2016) *Futur Med Chem*. 11:39-58.
4. Tan S, Mei Wong JL, Sim YJ, Wong S, Mohamed Elhassan SA. (2019) *Diabetes Metab Syndr*. 13(1):365-372.

CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NamH DE *Mycobacterium tuberculosis*

Regina Guerrero & Siseth Martínez-Caballero.
Instituto de Química, UNAM. Ciudad de México, 04510.
reginaguerreroza@gmail.com

Palabras clave: *M. tuberculosis*, *NamH*, resistencia a antibióticos.

Introducción. La tuberculosis es un problema de salud pública a nivel mundial causante de 1.8 millones de muertes al año (1). Este panorama se ha visto agravado por la aparición de cepas fármaco resistentes (FR) y multi-fármaco resistentes (MFR); por lo tanto es esencial el desarrollo de nuevas vacunas, herramientas de diagnóstico y antibióticos. Respecto a estos últimos, es prioritario la identificación de nuevos objetivos farmacológicos y moléculas candidatas para la síntesis de nuevos antibióticos. Uno de estos blancos farmacológicos es la proteína NamH que hidroxila a la molécula UDP-ácido-N-acetilmurámico (UDP-MurNac) para convertirla en UDP-ácido-N-glicolilmurámico (UDP-MurNGly). Estudios de supresión de este gen han demostrado un incremento en la susceptibilidad a lisozimas y antibióticos β -lactámicos (2).

La inhibición de NamH podría potenciar el uso de carbapenems (antibióticos β -lactámicos); razón por la cual, se convierte en un blanco importante para su estudio estructural y bioquímico.

Metodología. Mediante técnicas de Biología Molecular se llevó a cabo la clonación del gen *namH* de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* en el plásmido pCS157 (Fig. 1). La expresión heteróloga se realizó en *E. coli* BL21 DE3 pLyS y la purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel.

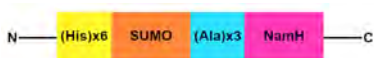


Figura 1 Diagrama de construcción de SUMO-NamH.

Resultados. La mayor cantidad de proteína se expresó de forma insoluble. Sin embargo, obtuvimos alguna cantidad en la fracción soluble la cual se pudo semi-purificar usando una cromatografía de afinidad a níquel obteniendo la elución de la proteína a 150 mM de imidazol (Fig. 2.A). Finalmente se separó la proteína SUMO de NamH usando a la proteasa ULP1 para su completa purificación (Fig. 2.B)

Además, se evaluó el contenido de estructura secundaria de la proteína mediante un espectro de

Dicroísmo Circular (DC) el cual nos indicó que la proteína no está desplegada (Fig. 3).

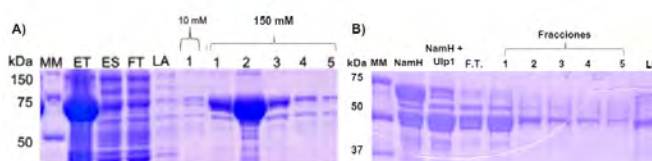


Figura 2. **A)** Gel SDS-PAGE al 10% de la purificación por afinidad a níquel de la proteína NamH-SUMO. ET representa el extracto total, ES el extracto soluble y FT el flow-through. **B)** Gel SDS-PAGE 12% del corte de la proteína SUMO-NamH usando la proteasa Ulp1. NamH-SUMO (70.8 kDa); NamH (58.4 kDa).

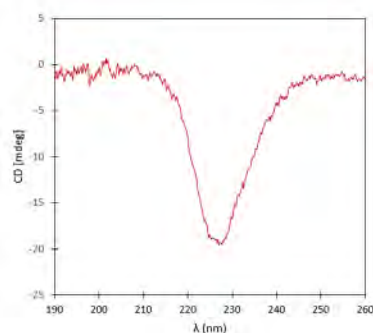


Figura 3. Espectro de DC obtenidos en el UV-lejano de NamH.

Conclusiones. Se logró obtener la proteína NamH de forma soluble y con contenido de estructura secundaria. Estos resultados nos permitirán, como segundo paso, evaluar la actividad catalítica de esta hidroxilasa.

Bibliografía.

1. WHO. (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research, and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. [who/emp/iau/2017.12](http://www.who/emp/iau/2017.12)
2. Raymond JB, Mahapatra S, Crick DC, Pavelka MS. (2005) *J Biol Chem.* 280(1):326-33.

AN *IN SILICO* PREDICTION OF INTERACTION OF INV F - RNAP IS MEDIATED BY THE CHAPERONE SIC A IN *SALMONELLA SP*

André Borges Farias¹, Daniel Cortés-Avalos², Jose Antonio Ibarra², Ernesto Pérez-Rueda¹

¹Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Académica del Estado de Yucatán, Mérida, 97302, México.

²Laboratorio de Genética Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, 11340, México.

andre.borges@iimas.unam.mx

Key words: InvF-RNAP complex; molecular dynamics; Salmonella invasion chaperone.

Introduction. *Salmonella* species are Gram-negative bacteria, widely distributed around the world and being most associated with human diseases. Thus, there is a global concern due to the amount of deaths every year. In this way, understanding the complex gene transcription mechanisms can assist the development of new therapies. The role of chaperones in the gene regulation has been described for many years and SicA acted together with InvF to activate the expression of essential genes for *Salmonella* pathogenicity. However, it is still not clear whether and how this could be the mechanism of interactions between them.

In order to understand the role of SicA in mediating the complex with InvF and RNAP, an exhaustive *in silico* analysis was carried out to identify pockets and protein-protein interactions.

Methodology. The structure of InvF (A0A0F7JCN6) was built using the Robetta program. A Blastp was performed with the SicA sequence (P69066) to find a template and build a homology model with the SWISS-MODEL server. The structure of carboxy-terminal domain of the alpha subunit of RNAP was obtained complexed with the MarA structure (PDB 1XS9). The web server CavityPlus was used to detect cavities and HADDOCK server to perform molecular docking. Molecular dynamics (MD) simulations were carried out with 500 ns of trajectory using Gromacs software. The binding affinity and alanine scanning mutagenesis (ASM) were performed with MM-PBSA protocol.

Results. The structural alignment between InvF and MarA allowed obtaining the α -CTD position which produced similar protein-protein and

formed a stable complex. A search for cavities in the complex were performed and a systematic study of molecular docking of SicA was conducted, showing that the interaction occurs preferentially with the TPR1 and TPR2 motifs. Molecular dynamics simulations showed the role of SicA in stabilizing HTH motifs (Figure 1), important regions for contact with DNA. MM-PBSA calculations revealed that SicA did not promote an increase of binding affinity between InvF and α -CTD, raising the hypothesis of the role of SicA in maintaining proper conformation, mainly in the DBD domain. The ASM (Figure 1D) showed that mutations in DBD caused the greatest changes in binding affinity with α -CTD. In addition, a key role in the N-term region was observed, since the mutation in R40 also produced a large decrease in binding affinity.

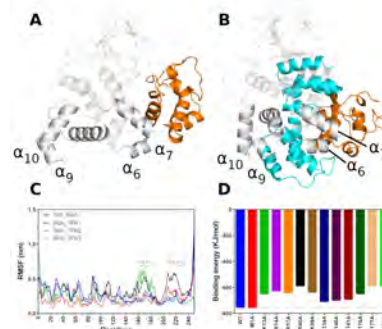


Fig. 1. Structural aspects of DBD stabilization by SicA.

Conclusions. This work presented molecular mechanisms of interaction between InvF and α -CTD and pointed out the role of chaperone SicA in stabilizing this complex.

Acknowledgments. The authors would like to thank CAPES (Finance Code 001), SINAPAD, Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (IN-220523) and CONACYT (320012).

CO-CRYSTALLIZATION OF HUMAN ORNITHINE DECARBOXYLASE WITH LYSINE ANALOG LIGANDS

Luis Janiel Navarro González¹, Edgar Morales Ríos¹ y María Viridiana Olin Sandoval², CINVESTAV Zacatenco, ¹ Departamento de Bioquímica, ² Departamento de Biotecnología, Ciudad de México, CP: 07360, edgar.morales@cinvestav.mx, viridiana.olin@cinvestav.mx

Key words: polyamines, ODC, crystallization

Introduction. Ornithine decarboxylase (ODC) participates in the first step of polyamines (PA) synthesis, which are involved in a wide variety of cellular processes. This enzyme decarboxylates ornithine to form putrescine. However, it has been found that some ODCs, including the human ODC (HsODC), also use lysine (Lys) as an alternative substrate to produce cadaverine (Cad) (1). Moreover, based on structural studies, it has been observed that Cad can bind to ODC at an allosteric site (2). Due to the implication of PA metabolism in cancer development, HsODC has been established as a therapeutic target for the treatment of this disease (3). However, the inhibitors developed for targeting this enzyme produce toxic effects at high doses (> 3 g/m²/day) in humans (4). Thus, considering the alternate activity of ODC with Lys and focusing on its allosteric site for Cad, we are proposing novel inhibitors with antiproliferative effects (5).

Therefore, the aim of this project was to determine the optimal crystallization conditions of HsODC in the presence of Lys analogues, that will contribute to obtain its 3D structure through X-ray crystallography.

Methodology. HsODC was overexpressed in *Escherichia coli*, and it was purified through three consecutive chromatography steps. The enzyme's purity was evaluated by AgNO₃-stained SDS-PAGE, and its identity was confirmed by WB using specific polyclonal antibodies against HsODC. Subsequently, we induced crystallization of the purified HsODC in the presence of the proposed ligands: sulfadiazine (Sulf) and aminocaproic acid (ACA), by the sitting-drop vapor diffusion method, and finally, we optimized the crystallization conditions.

Results. With our purification strategy we obtained 7 mg of HsODC per liter of culture, with a purity 99 % (Fig. 1). We have also optimized the crystallization conditions for PEG and salt concentrations, resulting in crystals that were consistently observed in all crystal formulations. The obtained crystals exhibited a hexagonal prism morphology, with a length from 80 to 100 μm and a thickness between 30 and 40 μm (Fig. 2). In the presence of both ACA and Sulf, larger crystals

were formed (100-140 μm) (Fig. 2B y2C). Although the obtained crystals had an appropriate size for single crystal X-ray diffraction analysis, they did not produce sufficient quantity and quality of reflections to determine the parameters of the unit cell.

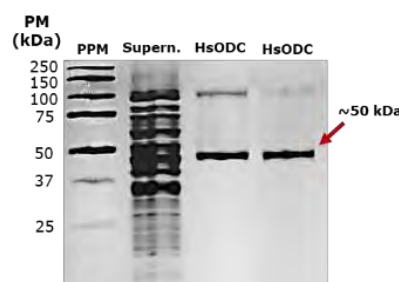


Fig. 1. AgNO₃-stained SDS-PAGE of the purified HsODC.

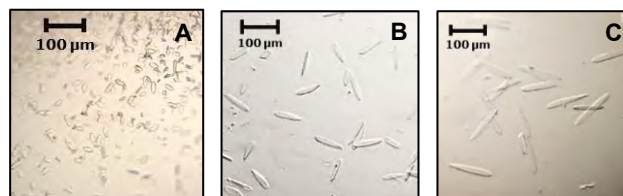


Fig. 2. HsODC optimized crystals. (A) In the absence of ligand. (B) In the presence of ACA. (C) In the presence of Sulf.

Conclusions. The crystallization of HsODC with novel Lys analog inhibitors, capable of binding to the substrate-binding site and/or the allosteric site present in the enzyme, will allow us to understand the involved inhibition mechanism and, in future projects, propose them to inhibit cancer development.

Acknowledgement. We thank to CINVESTAV and CONACyT funding.

References.

- Olin-Sandoval, V., Yu, J. S. L., Miller-Fleming, L., Alam, M. T., Kamrad, S., Correia-Melo, C., ... & Ralser, M. (2019). *Nature*, 572(7768), 249-253.
- Dufe, V. T., Ingner, D., Heby, O., Khomutov, A.R., Persson, L., & Al-Karadaghi, S. (2007). *Biochem. J.*, 405(2), 261-268.
- Wallace, H. M., & Fraser, A. V. (2004). *Amino acids*, 26, 353-365.
- Basuroy, U. K., & Gemer, E. W. (2006). *Biochem. J.*, 139(1), 27-33.
- Filisola-Villaseñor, J. G., Morales-Ríos, E. & Olin-Sandoval, V. (in preparation).

ESTUDIO *IN SILICO* DE LA CAPACIDAD DE OXIDACIÓN DE CARBAMAZEPINA POR LA VARIANTE AaeUPO-PaDa-I

Berenice Núñez-Salas¹, Marcela Ayala², Mayra Avelar¹, ¹Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioquimioinformática (LSAyB), Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, 98160, ²Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, 62210.
39207598@uaz.edu.mx

Palabras clave: PaDa-I, carbamazepina, simulaciones moleculares

Introducción. Los contaminantes emergentes son compuestos que se encuentran en una concentración baja (1); sin embargo, sin ser persistentes, son causantes de efectos negativos en el medio ambiente (2). El uso de enzimas para la eliminación de estos compuestos se presenta como una tecnología prometedora. Las enzimas oxidorreductasas tienen el potencial de transformar estos contaminantes y disminuir su impacto adverso (3). Específicamente, una enzima interesante es la peroxigenasa inespecífica (UPO); de la cual se ha desarrollado una variante por evolución dirigida, nombrada PaDa-I (4). Esta enzima podría presentar un potencial uso en la biorremediación. Esta investigación tiene como objetivo realizar un análisis *in silico* para determinar si PaDa-I es potencialmente capaz de oxidar la carbamazepina, un contaminante emergente, y establecer las características estructurales más importantes (ligando-proteína) para proponer posibles mutaciones que mejoren la interacción del compuesto con la enzima.

Metodología. Se tomó como modelo la estructura cristalográfica 5OXU en la base de datos del *Protein Data Bank (PDB)*. El modelo se preparó con la herramienta *Protein Preparation Wizard* del software *Maestro*. El ligando se descargó de la base de datos *PubChem*, se realizó una optimización geométrica empleando el programa *Gaussian16* con la metodología de Teoría de Funcionales de la Densidad (B3LYP/6-311g). Para los cálculos de acoplamiento molecular se utilizó como modelo una geometría de la proteína proveniente de una estructura promedio de dinámica molecular. Los cálculos se realizaron empleando el software *AutodockVina*, con 5 réplicas de cada cálculo. Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo tomando como base los complejos proteína-ligando en el programa *Desmond*.

Resultados. Se realizaron cálculos de acoplamiento molecular tanto para el modelo de referencia (5-nitro-1,3 benzodioxol [NBD]) como para el modelo de estudio (carbamazepina). Los puntajes de acoplamiento más favorables correspondieron a la carbamazepina y los menos favorables a NBD. Para la

carbamazepina el rango fue de -8.2 a -9.2 kcal/mol, mientras que para el NBD de -5.9 a -6.5 kcal/mol. Se estudió la capacidad del compuesto para hidroxilarse de acuerdo con su posición dentro de la cavidad. Se midió la distancia desde Fe²⁺ del grupo hemo hacia las posiciones reportadas como susceptibles a la hidroxilación. Las mediciones de NBD se encontraron desde 4.4 Å a 4.9 Å, mientras que para la carbamazepina de 7.0 Å a 10.0 Å. Debido a esto, se sugiere que la carbamazepina no es un sustrato susceptible a hidroxilación por PaDa-I. Asimismo, se realizaron simulaciones de dinámica molecular de 20 ns para determinar la estabilidad de los complejos predichos por los cálculos de acoplamiento molecular.

Conclusiones. De acuerdo con los cálculos de acoplamiento molecular, el NBD es susceptible a hidroxilación por PaDa-I, al posicionarse a una distancia menor de 5.0 Å del ion Fe²⁺ del grupo hemo. Por otro lado, el modelo de estudio se encuentra mayormente alejado, a distancias superiores de 7.0 Å, por lo que se asume que la distancia es un factor que limita la capacidad de la carbamazepina a ser hidroxilada por PaDa-I. Debido a lo anterior, se propone hacer uso del diseño racional para la realización de mutaciones sitio-dirigidas en la enzima para determinar si el modelo es capaz de acercarse y ser hidroxilado.

Agradecimientos. Los autores agradecen los recursos computacionales otorgados en la supercomputadora Miztli, **LANCAD-UNAM-DGTIC-293**. B. Núñez y M. Avelar agradecen al LSAyB por la infraestructura para realizar este trabajo. M. Avelar agradece a CONAHCYT por la beca posdoctoral, 364335.

Bibliografía.

1. Krishnakumar, S., Singh, D. S. H., Godson, P. S., & Thanga, S. G. (2022) *Environ Sci Pollut Res*. Vol 29: 1-3.
2. Petrović, M., Gonzalez, S., & Barceló, D. (2003). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Vol 22 (10): 685-696.
3. Morsi, R.; Al-Maqdi, K.A.; Bilal, M.; Iqbal, H.M.N.; Khaleel, A.; Shah, I.; Ashraf, S.S. (2021). *Biomolecules*. Vol 11(6): 1-16.
4. Molina, P., Garcia, E., Gonzalez, D., Ullrich R, Hofrichter M, Alcalde M (2014) *Appl Environ Microbiol*, Vol 80(11):3496-3507.

ESTUDIO DE MOLÉCULAS DE ORIGEN NATURAL COMO POTENCIALES INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA ESPIGA DEL SARS-COV-2

Andrés Rodríguez-Tapia, Michelle Rivera, Virginia Flores-Morales, Mayra Avelar, Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bio-quimioinformática (LSAyB), Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Zacatecas, 98160, 35162090@uaz.edu.mx

Palabras clave: SARS-CoV-2, acoplamiento molecular, dinámica molecular.

Introducción. La pandemia originada por la enfermedad COVID-19, provocó que se incrementaran el número de investigaciones para el desarrollo de posibles terapias antivirales para inhibir el virus del SARS-CoV-2. El estudio de técnicas asistidas por computadora representa una ventaja para la investigación de nuevos medicamentos, ya que acorta el tiempo en investigación y reduce los costos (1). El virus del SARS-CoV-2 utiliza una proteína de membrana (proteína espiga) para entrar a las células humanas, a través de la interacción del dominio de unión a receptor en la subunidad S1 (RBD) con la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2) (2). A partir de la inhibición de esta interacción, se analiza el uso de terapias basadas en compuestos naturales provenientes de plantas, ya que se ha reportado, poseen propiedades antibacterianas y antivirales (3). En este trabajo se propone el estudio, mediante métodos *in silico*, de moléculas provenientes de productos naturales (luteolina, gingerol y CBD) con potencial como inhibidores de la proteína espiga del SARS-CoV-2.

Metodología. Las estructuras de CBD, luteolina y gingerol, se obtuvieron de *PubChem*. El modelo de la proteína utilizado corresponde a la estructura cristalográfica proveniente del *Protein Data Bank* (PDB) 6M0J. Para la preparación de la proteína se utilizó el software MAESTRO 12.7. Adicionalmente, se utilizó el programa PROPKA para establecer los estados de protonación de la proteína a un pH 7.0. Para los cálculos de acoplamiento molecular se utilizó el software AutoDock Vina. El tamaño de caja para la simulación se basó en el radio de giro de cada molécula (4). Se realizaron 10 corridas. Posteriormente, se llevaron a cabo cálculos de dinámica molecular con el software Desmond, para determinar la estabilidad de los complejos, con producciones de 20 ns.

Resultados. Los puntajes de acoplamiento obtenidos corresponden a: i) CBD -6.0 kcal/mol, ii) gingerol -5.3 kcal/mol y iii) luteolina -5.9 kcal/mol, indicando que existe una interacción favorable ligando-proteína. Para establecer si la presencia de estos ligandos en la interfaz RBD-ACE2 inhibe la interacción de estas dos proteínas, se realizó un acoplamiento proteína-

proteína en donde la energía de interacción RBD-ACE2 corresponde a -86.99 kcal/mol, mientras que la interacción con la presencia de ligandos se encuentra alrededor de -71.5 kcal/mol, lo que refiere a una inestabilidad de la interacción por la presencia de estas moléculas (Fig. 1).

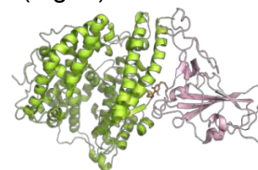


Fig. 1. Acoplamiento RBD-ACE2. RBD: color rosa, ACE2: color verde y en el centro se encuentra el ligando de color naranja.

Por otro lado, el cálculo de RMSF nos indica que la región de mayor movimiento se encuentra entre los aminoácidos 470-490 (Fig. 2), que es la zona de interacción entre RBD-ACE2. La presencia de la luteolina induce un mayor movimiento en esta zona

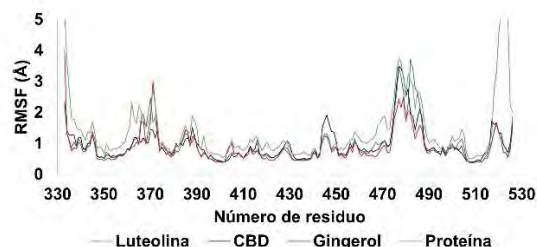


Fig. 2. Gráficos de RMSF (Å) para los tres sistemas estudiados.

Conclusiones. De acuerdo con los resultados obtenidos, todos los ligandos estudiados inestabilizan la interacción proteína-proteína. Mientras que los resultados de dinámica molecular sugieren que la luteolina al inducir un mayor movimiento, podría ser más probable que inhiba la interacción RBD-ACE2.

Agradecimiento. Los autores agradecen al LSAyB por la infraestructura y las facilidades para la realización de este trabajo. MA agradece a CONAHCYT por la beca posdoctoral, 364335.

Bibliografía. 1. Brogi, S., Castro, T., Kuca, K., Medina-Franco, J., Valko, M. (2020) *Front. Chem*, 8.
2. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., Wang, X. (2020). *Sci Rep*, 581:215-220.
3. Ling, C. (2020). *JIM*, 18(2): 87-88.
4. Feinstein, W.P., Brylinski, M. (2015). *Cheminform*, 7(18).

UNA NUEVA FAMILIA DE LECTINAS CON ESPECIFICIDAD POR ÁCIDOS URÓNICOS

Jeanette Loera Rubalcava y Alejandra Hernández Santoyo, Instituto de Química, UNAM. Ciudad de México, C.P. 04510, jealoru@hotmail.com.

Palabras clave: Lectinas, ácidos urónico, Megathura

Introducción. Las lectinas son proteínas de origen no inmune, que tienen un dominio de unión a carbohidratos y aglutinan células al interactuar con los sacáridos presentes en su superficie (1). La unión lectina-célula conduce a varias respuestas celulares, muchas de las cuales tienen un mecanismo desconocido. Sin embargo, la mayor parte de la investigación actual ha enfatizado la función de las lectinas en los mecanismos de inmunidad innata en invertebrados. Debido a esto, existe un interés creciente en la búsqueda y caracterización de nuevas lectinas con aplicación biotecnológica, a partir de organismos poco estudiados como el molusco marino *Megathura crenulata*.

Nuestro objetivo es caracterizar estructural y funcionalmente a una lectina que no pertenece a ninguna de las familias reportadas a la fecha.

Metodología. Se purificó una lectina (MCreL) del molusco *M. crenulata* (Fig. 1A) por cromatografía de afinidad a alginato seguida de una cromatografía de exclusión molecular. Su pureza se verificó por SDS-PAGE y MALDI-TOF. La actividad aglutinante de MCreL se evaluó sobre eritrocitos de conejo formalinizados (ECF), eritrocitos humanos (A⁺, B⁺ y O⁺) y células bacterianas (*E. coli DH5α*, *V. parahaemolyticus* y *L. plantarum*). Su especificidad se determinó mediante ensayos de inhibición de la actividad hemaglutinante utilizando 45 carbohidratos y se verificó por termofluorescencia. La presencia de glicosilaciones se determinó por tinción con ácido peryódico-Schiff. El contenido de estructura secundaria se estimó por espectroscopía de dicroísmo circular. La cuantificación de cisteínas libres y puentes disulfuro se realizó con el reactivo de Ellman.

Resultados. Se purificó una lectina utilizando una técnica novedosa de cromatografía de afinidad a alginato (Fig. 1B). Esta lectina se nombró como MCreL y mostró una masa de 22.2 kDa, está glicosilada (Fig. 1C) y en solución forma oligómeros de ~16 subunidades. En su estructura predominan las hebras β y tiene dos puentes disulfuro. MCreL no es dependiente de Ca²⁺ y presentó mayor actividad hemaglutinante sobre los eritrocitos A⁺>O⁺>B⁺>ECF, tiene elevada estabilidad en un amplio intervalo de temperatura (5-75 °C) y pH (2-9). Esta lectina mostró especificidad por ácidos urónicos (Fig. 1D) o

carbohidratos constituidos por éstos con una concentración mínima inhibitoria de 0.12, 5.67, 27.78 y 83.33 mM con la heparina, LGulA, GalA y GlcA, respectivamente. MCreL inhibió el crecimiento de *E. coli DH5α* (Fig.1E); y con 4.7 μg de lectina fue suficiente para aglutinar estas células bacterianas (Fig.1F).

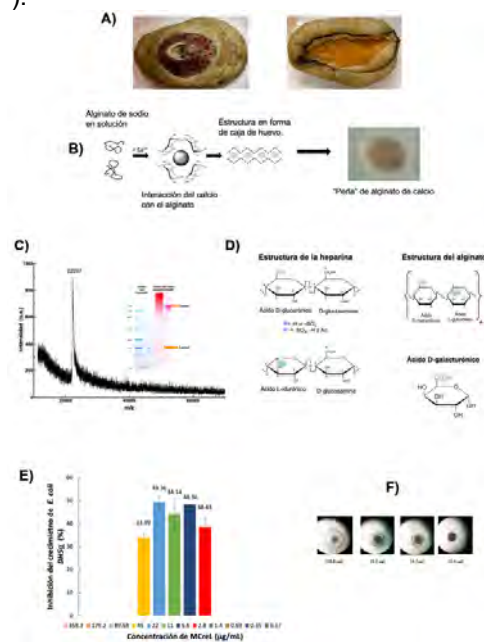


Fig.1. A) *Megathura crenulata*. B) Perlas de alginato utilizadas para la purificación de MCreL. C) Masa de MCreL determinada por espectrometría de masas y SDS-PAGE. Se muestra la tinción con ácido peryódico-Schiff utilizando como control positivo de la presencia de glicosilaciones a la fetuína D) Azúcares que reconoció la lectina. E) Actividad de MCreL sobre *E. coli DH5α*. Inhibición del crecimiento. F) Aglutinación de las células.

Conclusiones. MCreL es una lectina con especificidad por ácidos urónicos, que podría pertenecer a una nueva familia de lectinas animales. La actividad de MCreL sobre patógenos sugiere que puede formar parte del sistema de inmunidad innata de *M. crenulata*.

Agradecimiento. Al CONACYT por la beca doctoral No. de CVU:915258 y al PAPIIT por los fondos otorgados por medio del proyecto IN213022.

Bibliografía. 1. Singh, R. and Walia A. (2014) *Symbiosis*. 62 (3): 123-134.

The in silico study of the phosphate-starvation-2 enzymes from terrestrial plants reveal their strong structural similarity to Human phosphocholine/phosphoethanolamine phosphatase, and to bacterial MtnX phosphatase.

Evelyn Bellmunt-Espíndola, Juan Carlos Islas-Arciga, Alfonso Zamora-Hernández, Lilian Gabriela Valencia-Turcotte and Rogelio Rodríguez-Sotres*. Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ave. Universidad 3000, Col. Cd. Universitaria, Alc. Coyoacán, C.P. 04510. Cd. México. *e-mail: sotres@unam.mx

plant phosphate starvation 2; haloacid dehalogenase superfamily; protein evolution

Introduction

When soils are low in bioavailable phosphorous, green plants highly overexpress Phosphate-Starvation-2 proteins (PS2; 1) members of the haloacid dehalogenase superfamily (HADsf). These have been proposed to act as Mg²⁺-dependent phosphatases (Pase) of wide specificity, as a Mg²⁺-phosphoprotein Pase (PprotPase), as Mg²⁺ activated pyrophosphatase (PPase), and/or as Mg²⁺-dependent phosphoethanolamine/choline Pase (PECPase). Thus, their physiological function is still under debate (2).

Methods

Several PS2-related HADsf enzymes from Bacteria, Archaea and Eukarya were analyzed using available experimental (PDB) or predicted structures (3,4). Phylogeny was inferred from a structurally-based sequence alignment (5) with ML/LG+G+I in MEGA11 (6). Protein-ligand formation enthalpies (ΔH_f) were calculated using semiempirical Quantum Mechanics (sQM) on reference-optimized geometries (7; PM7-LMO) as $\Delta H_f(\text{complex}) - \Delta H_f(\text{protein}) - \Delta H_f(\text{ligand})$.

Results

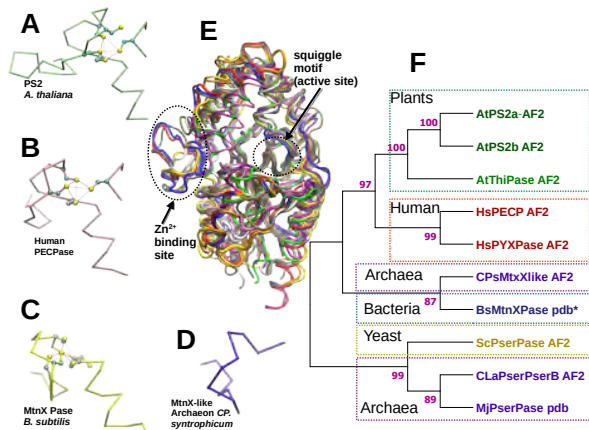


Figure 1. Structural comparison of the insertion loop (A-D) overview (E) and phylogeny (F) of PS2-related HADsf selected members across life domains.

The analysis of *A. thaliana* PS2 (AtPS2a) and two paralogous (AtPS2b & AtThiPase) revealed an unusual Cys₄ zinc-finger (Znf) at a central insertion (Fig 1A), next to a conserved and putatively catalytic lysine. The Znf is predicted in Human PECPase (HsPECP; Fig. 1B), Human pyridoxal phosphate Pase (HsPYXPase), and is found in the bacterial 2-hydroxy-3-keto-5-methylthiopenteny-1-phosphate (MtnX) Pase (pdb

2FEA; Fig 1 C BsMtnXPase), but is missing in related archaeal HADsf members (Fig 1D). Comparisons of their topology and structure (Fig. 1E) and structurally-based phylogenetic analysis (Fig 1F) suggest a different origin for the bacterial and eukaryotic Znf counterparts. Probably arising by a combination of divergent evolution of the core and convergent evolution of two independent insertions. Docking studies and sQM calculations of enzymes-ligand complexes are consistent with PECPase (Table 1) and/or with phosphorylated amino acid Pase activities (not shown). Instead, a bacterial well characterized HADsf PPase lacked a Znf motif and its Mg²⁺ binding site features an ASP to ASN mutation, consistent with the binding of a tetraanion (PPi⁴⁻).

These result extended to other plant species such as *Capsicum annuum* L. (not shown) indicate this Znf to be a general feature of PS2-like enzymes in plants, but their role remains to be investigated.

Table 1. Enthalpy of formation of selected PS2-related protein-ligand complexes.

| Protein | ligand | ΔH_f (kCal/mol) |
|------------|----------------|-------------------------|
| AtPS2a | phosphocholine | -37.4 |
| | pyrophosphate | -27.6 |
| BsMtnXPase | MtnX | -43.4 |
| | phosphocholine | -12.3 |
| AtThiPase | thimine-PP | -44.9 |
| | phosphocholine | -29.7 |

Conclusion

From in silico analysis PS2-like plant enzymes have a Znf and show a preference for PECPase over PPIase, as physiological activity of plant PS2 enzymes.

Acknowledgements

Funding LANCAD-UNAM-DGTIC-215, PAPIIT-DGAPA-UNAM IN216815, CONAHCyT CB-2018-A1-S-8650. PAIP-FQ-UNAM-5000-9122. Thank to SC-DGTIC-UNAM technical assistance.

References

1. Stenzel I, Ziethe K, Schurath J, Hertel ScC, Bosse D, Köck M, (2003) *Physiologia Plantarum* 118: 138–146.
2. Angkawijaya Ae, Nakamura Y (2017) *Biochem Biophys Res Com* 494: 397–401.
3. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, et al. (2022) *Nucleic Acids Res* 50: D439–D444.
4. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M (2022) *Nat Methods* 19: 679–682.
5. Roberts E, Eargle J, Wright D, Luthey-Schulten Z (2006) *BMC Bioinformatics* 7: 382.
6. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) *Mol Biol Evol* 38: 3022–3027.
7. Stewart JCP (2016) MOPAC2016, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, OpenMOPAC.net

ESTUDIO DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE UNA LECTINA DEL MEJILLÓN *Mytilus californianus*

Jessica Loera Rubalcava y Alejandra Hernández Santoyo,

Instituto de Química, UNAM, CDMX, C.P. 04510, jessoerar@gmail.com.

Palabras clave: lectinas, oligomerización, galactósidos

Introducción. Las lectinas son proteínas de origen no inmune capaces de unir carbohidratos. La oligomerización de estas proteínas a menudo es crítica para el reconocimiento de su ligando y sus funciones biológicas. rMCL-1 es una lectina aislada del mejillón *Mytilus californianus*. En solución forma dímeros (1), y en presencia de sus ligandos forma oligómeros de mayor tamaño.

El objetivo de este proyecto es estudiar los determinantes estructurales que ocasionan la oligomerización en rMCL-1, mediante la introducción de mutaciones que alteren su estado oligomérico y evaluar su efecto en las propiedades de la lectina.

Metodología.

Se obtuvo de manera recombinante a la lectina rMCL-1 y se analizaron. Con base en el análisis de las estructuras terciarias obtenidas por difracción de rayos X en ausencia de ligandos y en co-cristalización con galactósidos se eligieron tres dobles mutantes que se purificaron por cromatografía de afinidad a níquel. Su actividad se evaluó mediante la aglutinación eritrocitos. La especificidad por carbohidratos se determinó mediante ensayos de inhibición de la actividad hemaglutinante, la estabilidad estructural mediante fluorimetría diferencial de barrido y los parámetros termodinámicos de la interacción lectina-carbohidrato por calorimetría de titulación isotérmica.

Resultados. Mediante el análisis de la estructuras seleccionamos 3 mutantes dobles (Fig.1, Panel A): F94D-F95S para obtener de forma monomérica a la lectina, K140A-K144A responsables de la interacción proteína-carbohidrato entre subunidades y D86A-D143A aminoácidos involucrados en las interacciones proteína-proteína. Se observó que las mutantes difieren en actividad sobre eritrocitos de conejo formalinizados y eritrocitos frescos A⁺, siendo F94D-F95S la que presenta la menor actividad. Todas las mutantes se inhibieron con los mismos azúcares que rMCL-1 (α/β galactósidos), con excepción de la mutante F94D-F95S que no fue inhibida por la α y β lactosa. Todas las mutantes presentan una T_m menor a la de rMCL-1. En presencia de galactósidos el valor de la T_m aumentó considerablemente para todas las mutantes (hasta en 27 °C) con excepción de F94D-F95S que mostró un incremento de 30 °C con α -

lactosa (Fig. 1 Panel B). Las constantes de asociación determinadas por ITC mostraron que la mutante F94D-F95S es la más afín por todos los ligandos probados, esto resulta de un cambio muy importante en las contribuciones entálpicas y entrópicas. (Fig. 1 Panel B). Finalmente, rMCL-1 y sus mutantes fueron capaces de aglutinar e inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* M0607.

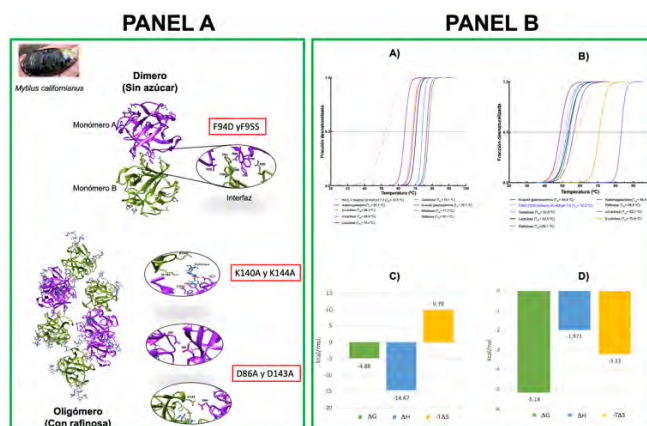


Fig1. Panel A. Estructura de rMCL-1. Se observa la forma dimerica en ausencia de azúcares y el oligómero en presencia de rafinosa. Se observan en círculos las interacciones que consideramos importantes para la formación del oligómero y en cuadros rojos las mutantes a estudiar. Panel B. se observa la estabilidad con galactósidos determinada por fluorimetría diferencial de barrido. A) rMCL-1. B) mutante F94D-F95S. En C) y D) se observa la firma termodinámica de la interacción con galactosa para rMCL-1 y F94D-F95S respectivamente.

Conclusiones. El estado oligomérico de las lectinas tiene un efecto importante en la estabilidad, afinidad y función biológica. Dilucidar los factores clave que sirven como motores de la asociación cuaternaria permitiría modular la oligomerización y de esta manera potenciar actividades, conseguir una función definida o diseñar oligómeros artificiales para diversas aplicaciones.

Agradecimiento. Al CONACyT por la beca doctoral CVU:915264 y al PAPIIT por los fondos otorgados por medio del proyecto IN213022.

Bibliografía. 1. García-Maldonado, E., Cano-Sánchez, P. y Hernández-Santoyo, A. (2017) *Fish Shellfish Immunol.* 66: 564-5

HISTORIA EVOLUTIVA DE LA INTERACCIÓN ENTRE NRC3, UN COMPONENTE DEL SISTEMA DE INMUNE VEGETAL, Y SPRYSEC15 DE *Globodera rostochiensis*

Claudia Martínez-Anaya^{1,2}, Yu Sugihara², Jiorgos Kourelis², AmirAli Toghani², Mauricio Contreras², Muniyandi Selvaraj², Sophien Kamoun². ¹Instituto de Biotecnología, UNAM. 62210, Cuernavaca, Mor. México. ²The Sainsbury Laboratory. NR4 7UH Norwich, UK. claudia.martinez@ibt.unam.mx

Palabras clave: Reconstrucción de secuencias ancestrales, interacción de proteínas, SPRYSEC15, muerte celular.

Introducción. La reacción hipersensible (HR) de las plantas se caracteriza por la muerte celular inducida localmente ante la presencia de efectores de patógenos para contener la propagación del microorganismo. Esta HR depende de una red de receptores NLRs que interactúan específicamente con el efector y comunican la señal a proteínas NRC, que son las ejecutoras de la muerte celular al formar un oligómero (o resistosoma) que se inserta en la membrana alterando la homeóstasis de iones (1). El nemátodo fitopatógeno *Globodera rostochiensis* produce efectores de la familia SPRYSEC, uno de los cuales (SPRYSEC15) se une directamente e inhibe la actividad de NRC2 y NRC3, que actúan río abajo del receptor (2). Esto implica que el modelo evolutivo gen-por-gen de la interacción efector-receptor (3) puede extenderse a otros miembros de este sistema inmune, imponiendo una presión selectiva en el hospedero para evitar la interacción. En este trabajo analizamos la historia evolutiva de la interacción entre SPRYSEC15 y NRC3.

Metodología. Usando la estructura del complejo NRC1-SPRYSEC15, se identificaron tres regiones de interacción para NRC3-SPRYSEC15. Con base a la filogenia de genes NRC, reconstruimos tres secuencias ancestrales de estas regiones en NRC3 de *N. benthamiana* hasta seis nodos previos a la separación entre Nicotianeae y otras solanáceas. La formación de resistosomas de las variantes de NRC3 ancestrales y vigentes fue analizada mediante native blue-PAGE y western blot. La muerte celular se cuantificó por expresión transitoria de los genes en hojas de *N. benthamiana*.

Resultados. Nuestros datos muestran que las proteínas ancestrales anc_1.1 y anc_1.2 *NbNRC3* y anc_1 *S/NRC3* eran suprimidas por SPRYSEC15, pero la mutación D316K (y en menor grado, otras mutaciones en diferentes especies), ocurrida en el

nodo más antiguo que separa al género *Nicotiana* de otras solanáceas como *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum* y *Capsicum annum*, evade la supresión por SPRYSEC15. El escape de la supresión coincide con la formación de resistosomas de NRC3 y muerte celular, aún en presencia del inhibidor.

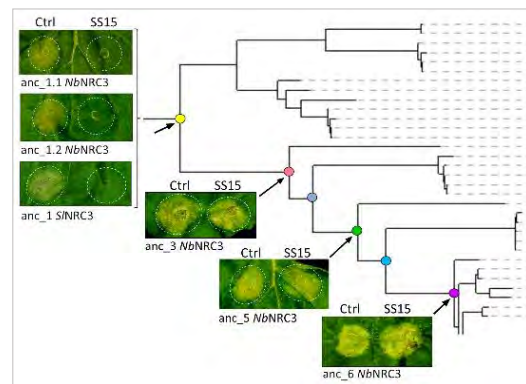


Figura 1. Muerte celular en *N. benthamiana* expresando transitoriamente genes ancestrales de NRC3 en diferentes nodos de la filogenia, en presencia o ausencia del efector SPRYSEC15.

Conclusión. Las proteínas modernas NRC3 son polimórficas en residuos involucrados en la interacción con SPRYSEC15, lo que permite trazar la historia evolutiva con respecto a la interacción y supresión por el efector. Nuestros datos indican que el modelo gen-por-gen opera a diferentes niveles de la red de respuesta activada por efectores.

Agradecimiento: Al programa PASPA-DGAPA de la UNAM por el apoyo sabático para desarrollar esta investigación. A todo el equipo de apoyo del Sainsbury Laboratory.

Bibliografía.

1. Balint-Kurti, P. (2019) Mol Plant Pathol, 20: 1163-1178.
2. Contreras, MP. et al. (2023). EMBO 42:e111519
3. Derevnina L., et al. (2021). PLoS biology, 19(8), e3001136
4. Adachi, H., & Kamoun, S. (2022). Essays in Biochemistry, 66(5), 541-549

MANGANESO PEROXIDASA Y LA INGENIERÍA DE PROTEÍNAS: UNA ENZIMA CON POTENCIAL USO EN LA BIORREMEDIACIÓN

Alondra Saucedo-Hernández, Mayra Avelar, Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioquimioinformática (LSAyB), Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Zacatecas, Zac., 98160, 37182747@uaz.edu.mx.

Palabras clave: manganeso peroxidasa, biorremediación, ingeniería de proteínas

Introducción. Las enzimas manganeso peroxidadas (MnPs) son glicoproteínas con un grupo prostético hemo que reaccionan de manera no específica con compuestos orgánicos al eliminar un electrón de los sustratos. Esta reacción la realizan por medio de la oxidación del manganeso pasando de un estado de oxidación +2 a +3, en donde el manganeso oxidado tiene un alto potencial redox (1). Debido a su capacidad de oxidación de compuestos orgánicos, las MnPs tienen un uso viable en la biorremediación de contaminantes en el medio ambiente. Se ha reportado que son capaces de degradar compuestos fenólicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y pesticidas (2).

En este trabajo se realiza una investigación bibliográfica sobre las características de la MnP y el mejoramiento de la estabilidad operacional de la enzima a través de ingeniería de proteínas.

Metodología. Realizar una búsqueda bibliográfica en bases de datos de las características e ingeniería de proteínas en la enzima MnP y su posible uso en procesos de biorremediación. La información se eligió de acuerdo con los años de publicación de los artículos, principalmente en un rango del 2018-2023.

Resultados. La MnP es producida por hongos de pudrición blanca que son capaces de secretar enzimas modificadoras de la lignina (LME); entre las que se incluyen: la lacasa (Lac), la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP). Las enzimas pertenecientes a las MnPs han sido aisladas de hongos tales como: *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinula edodes*, *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens* (3). Estas enzimas son de interés para su uso en procesos de biorremediación de contaminantes orgánicos ya que son capaces de oxidarlos. Por ejemplo, los plaguicidas son contaminantes que provocan daños al ambiente y a la salud de los humanos, al ser potencialmente tóxicos. Proviene del uso en la agricultura al ser sustancias que se utilizan para proteger los cultivos contra insectos, malas hierbas, hongos y otras plagas (4).

La MnP para oxidar compuestos orgánicos, como los plaguicidas, lleva a cabo un mecanismo catalítico en el

que reacciona con el peróxido de hidrógeno en 3 pasos: i) la MnP reacciona con el H₂O₂ y produce el Compuesto I (especie inestable, catión-radical oxoporfirina) y H₂O, ii) el Compuesto I oxida al Mn²⁺, por la transferencia de un electrón, y produce el Compuesto II, iii) por último el Compuesto II oxida otra especie de Mn²⁺ para generar el estado basal de la MnP, Mn³⁺ y H₂O₂. Aquí, los iones Mn³⁺ generados son capaces de reaccionar con compuestos orgánicos (3). La MnP tiene una reactividad muy alta con H₂O₂ y en presencia de un sustrato pobre y un exceso de H₂O₂, la enzima puede inactivarse (5); lo cual representa un reto para su aplicación en procesos de biorremediación. Con el objetivo de tener una solución a la inactivación de la MnP se propone el uso de la ingeniería de proteínas enfocado en diseño racional asistido por computadora; es decir, estudiar los posibles sitios oxidables y hacer mutaciones sitio-dirigidas que mejoren su estabilidad operacional.

Conclusiones. La enzima MnP tiene el potencial de oxidar compuestos orgánicos como los pesticidas que son altamente tóxicos, por lo que es importante realizar investigaciones y por métodos computacionales estudiar los sitios oxidables para que su estabilidad operacional sea mejorada respecto a su inactivación por H₂O₂, y esto no sea un impedimento para su aplicación en procesos de biorremediación.

Agradecimientos. Los autores agradecen al LSAyB por la infraestructura y las facilidades para la realización de este trabajo. MA agradece a CONAHCYT por la beca posdoctoral, 364335.

Bibliografía.

1. Chowdhary, P., Shukla, G., Raj, G., Romanholo LF & Naresh R. (2018) *SN Appl. Sci.* 1 (45):1-12.
2. Chang, Y., Yang, D., Li, R., Wang T. & Zhu Y. (2021) *Molecules.* 26(15).
3. Saikia, S., Yadav M., Hoque R.A. & Yadav H.S. (2023) *BCBT*, 41 (3):161-173.
4. World Health Organization. (2022) Pesticide residues in food. WHO. Septiembre, 2022.
5. Bermek, H., Li, K & Eriksson, K.-E. (2002), Studies on inactivation and stabilization of manganese peroxidase from *Trametes versicolor*, 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 141-149.

PROTEIN STRUCTURE: AN APPROACH THROUGH DUAL QUATERNIONS

David Orbe, Joel Ireta, Universidad Autónoma Metropolitana, Chemistry Department, Mexico City, 09340, orbe@xanum.uam.mx

Keywords: main chain, dual quaternion, rigid body.

Introduction. Secondary structure is a level in the classification of protein structure and is used to identify protein features for fold recognition. In this work, we implicate two elements: main chain conformations of proteins and dual quaternions [1-2].

the peptide plane: a rotation and a translation [3-4]. This methodology provides a natural and intrinsic characterization of the main chain of proteins. Our examples show that it is possible to use dual quaternions to provide a geometric characterization of the main chain of proteins.

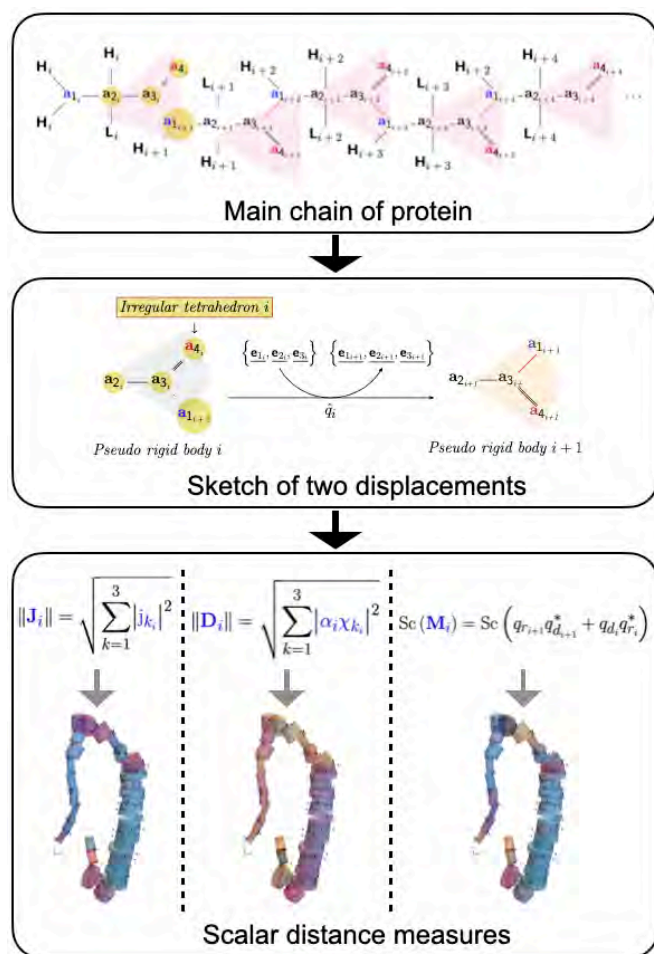


Fig. 1. The fundamental geometric ingredient is the definition of the rigid body through the atomic positions of $N = a_1$, $C_\alpha = a_2$, $C = a_3$ and $O = a_4$. Next, the representation of two displacements of a rigid body and a pseudo-rigid body through a dual quaternion. Finally, from the operations with quaternions we obtained three distance measures for the characterization and clustering of the main chain.

Geometrically speaking, the basic idea is to apply the dual quaternion to represent two displacements of

Methodology. We have considered the atomic positions of the peptide bond for the geometric construction. For the representations of the two displacements we use the operations with dual quaternions. To describe the protein skeleton we propose three scalar distance measures $\|J\|$, $\|D\|$ and $Sc(M)$. We investigate a set of proteins from the protein data bank (PDB) with a sequence identity of 30% at most. To clustering the data we use a k-means clustering algorithm.

Results. The total number of protein structures analyzed was 26,658. Regarding the scalar measures, $\|J\|$ gives the change of the screw axis associated with each transformation without involving the distance between the alpha carbons, our centers of the orthonormal triad. $\|D\|$ provides orientation information and also implies the distance between the alpha carbons involved. Finally, the operation in $Sc(M)$ implies a scalar measure where the vector part of the quaternion is zero. In this way, the information about rotation and translation is contained in the scalar part of the resulting quaternion M .

Conclusions. We have only used the fact that to each irregular tetrahedron, pseudo-rigid body, we have associated an orthonormal triad, to be able to carry out the two displacements. Scalar measurements strongly depend on the definition of the rigid body of the main chain of proteins.

Acknowledgment.

National Scholarship issued by CONAHCYT.

References.

1. Hamilton, W. (1899) Section 10. In: *Elements of Quaternions*. Jasper, C. Longmans, Green, and CO., EE.UU., 157-160.
2. Clifford, M. *Proc. London Math. Soc.* (1871), Vol (s1-4), 381-395.
3. Prošková, J. *J. Mol. Struct.* (2014), Vol (1076), 89-93.
4. Rooney, J. *Environ Plann B Plann Des.*(1978), Vol (5), 45-88.

OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y ESTRUCTURAL DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS CAPACES DE INHIBIR A LA PROTEÍNA FOSFATASA DE TIROSINA 2 QUE CONTIENE EL DOMINIO HOMÓLOGO SH2

Brenda Paola Gutiérrez Soto¹, Claudia Isela Avitia Domínguez¹, Adriana Castillo Villanueva², Jesús Antonio Oria Hernández², **Alfredo Téllez Valencia**¹. ¹Facultad de Medicina y Nutrición, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad y Fanny Anitua S/N, Durango 34000, atellez@ujed.mx. ²Insurgentes Sur 3700 Letra C, Av. Insurgentes Sur 3700, Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, 04530 Ciudad de México, CDMX.

Palabras clave: SHP2, derivados de bencimidazol, cáncer.

Introducción. El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo y en la actualidad existen distintos tipos de tratamientos para esta enfermedad sin embargo presentan efectos secundarios aunado a que no todos los pacientes son candidatos a estos tratamientos, por esto es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas farmacéuticas, bajo este concepto tenemos a la enzima SHP2 (1,2). La enzima SHP2 participa en distintas vías de señalización las cuales están implicadas en procesos importantes como lo son; proliferación celular, proliferación tumoral, metástasis, daño al ADN y a la replicación (3). Actualmente se han reportado distintas mutaciones de la SHP2 las cuales se han asociado con diversos tipos de cáncer (4).

Objetivo: Obtener y caracterizar mediante cinética enzimática y modelado molecular, moléculas pequeñas capaces de inhibir a la SHP2.

Metodología. Clonación y purificación de la SHP2:

Se clonó y sobreexpresó el gen PTPN11 el cual codifica para esta enzima en el vector pET28a y se purificó el dominio catalítico de la enzima mediante cromatografía de afinidad. **Ensayos de inhibición:** se ensayó *in vitro* una quimioteca de 108 moléculas derivados de bencimidazol a diferentes concentraciones conforme la solubilidad de cada molécula que fueron de 500 μ M a 30 μ M. **Docking molecular:** Se realizó un docking ciego en el dominio catalítico de la enzima con el software autodock vina, la caja de acoplamiento se situó en las coordenadas; X= 16.33, Y= -40.57 y Z= 35.24, con un tamaño en X= 64, Y= 74.2 y Z= 58, con un spacing 1 nm.

Propiedades ADME-Tox: el cálculo de las propiedades ADME-Tox y Drug-like se realizó en el programa Data Warrior.

Resultados. Los ensayos de inhibición mostraron que las 5 moléculas más potentes fueron **INT-10**, **LTCN7**, **LTCN8**, **C1BZN-NHCF3**, y **LTCN6**, con un porcentaje de inhibición a 30 μ M de 97, 91, 82, 56, y 52%, respectivamente. El análisis estructural del complejo SHP2-inhibidor mediante acoplamiento molecular,

sugirió que para las moléculas **INT-10** y **C1BZN-NHCF3** existen 3 potenciales sitios de unión, uno de ellos fue el sitio activo de la enzima. Por otro lado, para las moléculas **LTCN6**, **LTCN7** y **LTCN8** se encontró un único sitio de unión que no correspondió al sitio activo. La predicción de las propiedades ADME-Tox, mostró que de las 5 moléculas evaluadas ninguna presentó potenciales efectos mutagénicos, tumorigénicos e irritantes. Sin embargo, en efectos reproductivos las moléculas de la serie **LTCN** presentaron un riesgo bajo mientras que la **C1BZN-NHCF3** presentó un riesgo alto. En general, se puede decir que desde el punto de vista su estructura, los inhibidores tienen las características necesarias para ser considerados candidatos a fármacos.

Conclusiones. Se encontraron 5 moléculas capaces de inhibir a la SHP2 las cuales pueden servir como punto de partida para el diseño de un nuevo fármaco contra el cáncer.

Bibliografía.

1. Organización Mundial de la Salud. Cáncer, 2022 (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, consultado en junio de 2023).
2. American Cancer Society. Tipos de tratamiento, s.f. (<https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento.html>, consultado en junio 2023).
3. Rehman AU, Rahman MU, Khan MT, Saud S, Liu H, Song D, et al. 2018. *The Landscape of Protein Tyrosine Phosphatase (Shp2) and Cáncer*.
4. Zeng LF, Zhang RY, Yu ZH, Li S, Wu L, Gunawan AM, et al. 2014. *Therapeutic potential of targeting the oncogenic SHHP2 phosphatase*.

PURIFICATION OF RECEPTOR BINDING DOMAIN OF SARS-COV-2 B1.1.529 (OMICRON) AND ITS SUBSEQUENT DETECTION WITH NANOBODIES

Karim Romero Rangel, Jaime Ortega López, Claudia Guadalupe Benítez Cardoza and Edgar Morales Ríos

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Departamento de Bioquímica, Mexico City, 07360, karim.romero@cinvestav.mx, edgar.morales@cinvestav.mx

KeyWords: RBD-Omicron, Nanobodies, Detection

Introduction. SARS-CoV-2 is a β -coronavirus that caused the global pandemic COVID-19. The virus binds to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) on epithelial cells through the receptor-binding domain (RBD) of the spike protein, allowing it to anchor to the host cell and to introduce its genetic material ⁽¹⁾. Globally, the current predominant variant is Omicron, and it is characterized by having 15 mutations in the RBD domain compared to the WT. These differences make Omicron RBD less stable, more dynamic, and induces evasion of neutralizing antibodies against older variants ⁽²⁾. Nanobodies, derived from camelid heavy chain antibodies (HcAbs), can be produced as recombinant proteins through genetic engineering and they could be labeled with fluorochromes. Compared with regular antibodies, nanobodies has several advantages mainly due to its size (15 kDa) ⁽³⁾. In this study, we have cloned, expressed, purified, and refolded the RBD-Omicron domain of the SARS-CoV-2 Omicron variant and it was detected by Western Blot (WB) using fluorochrome-labeled secondary nanobodies, which were also purified and labeled in this work.

Methodology. The RBD-Omicron domain was expressed in *E. coli*, followed by purification and refolding using liquid chromatography. Refolding studies were performed using Circular Dichroism. Additionally, purification and labeling of the anti-mouse nanobody were carried out using IMAC and SEC chromatography. For the maleimide-fluorochrome nanobody labeling we followed the Cy5 and Cy3 Maleimide Mono-Reactive manual instructions (Cytiva). For the WB, the RBD-Omicron was used as an antigen, with an RBD-WT primary antibody and our fluorescently labeled nanobody used as the secondary.

Results. The RBD-Omicron (34 kDa) was purified and refolded from inclusion bodies with a final yield of 19 mg/L of cell culture (Fig 1A), showing a folded structure consistent with 32 % beta sheets and 7 % alpha helices, matching with the RBD deposited structures. The nanobody was purified with a yield of 10 mg/L and labeled with a staining ratio of 1.06

dye/protein (Fig 1B). For the WB, we used the purified RBD-Omicron, the RBD-WT primary antibody, and the nanobody labeled with the Cy5 fluorochrome, allowing for the detection of both monomers and oligomers of RBD-Omicron (Fig 1C).

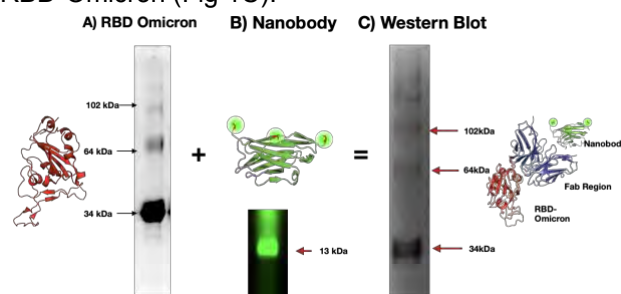


Figure 1: Purification and detection of RBD-Omicron. (A) SDS-PAGE of the purified RBD-Omicron, the structure was obtained from PDB: 7WRZ. (B) Purified and labeled nanobody, along with a representation of this nanobody modeled by AlphaFold. (C) WB of the purified RBD-Omicron, with the RBD primary antibody and the secondary fluorescent nanobody. The representation is a conjugate of last two structures.

Conclusions. We have cloned, overexpressed, and purified the RBD domain of the SARS-CoV-2 Omicron variant in prokaryotic cells from inclusion bodies, streamlining the production process of this domain for immunogenicity studies, treatment, and/or vaccines. Additionally, we have detected this protein using fluorescent nanobodies that were also purified and labeled in this study.

Acknowledgement. To Secretary of Planning of CINVESTAV, Dr. Martha Espinosa for providing part of the resources for this research and Dra. Cedillo Barrón for providing the primary antibody anti-RBD WT.

References.

- 1.- Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. (2022) *Nat Rev Mol Cell Biol.* Vol 23:3-20.
- 2.- Yin W, Xu Y, Xu P, Cao X, Wu C, Gu C, He X, Wang X, Huang S, Yuan Q, Wu K, Hu W, Huang Z, Liu J, Wang Z, Jia F, Xia K, Liu P, Wang X, Song B, Zheng J, Jiang H, Cheng X, Jiang Y, Deng SJ, Xu HE. (2022) *Science.* Vol 376: 1048-1053
- 3.- Muyldermans S. (2013) *Annu Rev Biochem.* Vol 82:775-797.

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA PROTEÍNA HPr DEL ORGANISMO TERMÓFILO *B. STEAROTHERMOPHILUS* POR DINÁMICA MOLECULAR

Salomón J. Alas Guardado¹, Ana K. Gómez Flores¹, Edgar López Pérez²

¹Departamento de Ciencias Naturales, UAM Cuajimalpa, Ciudad de México 05300.

²Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM Cuajimalpa, Ciudad de México 05300.

salas@cua.uam.mx (SJAG)

Palabras clave: proteína BstHPr, estabilidad térmica, puentes salinos

Introducción La proteína histidina fosfotransportadora (HPr) es una estructura monomérica conservada en bacterias grampositivas, que pueden ser de naturaleza mesófila o termófila (1). En particular, la proteína HPr procedente del organismo termófilo *Bacillus stearothermophilus* (*BstHPr*) es un buen modelo para estudios de termoestabilidad, ya que se cuenta con los datos experimentales de la estructura cristalográfica y las curvas de estabilidad térmica (2). Sin embargo, su mecanismo de desplegamiento a temperaturas elevadas aún no está claro a nivel molecular. Por tanto, en este trabajo se investigó la estabilidad térmica de esta proteína realizando simulaciones de dinámica molecular (DM). Los análisis de los diferentes parámetros estructurales y de las interacciones moleculares se compararon con los de la proteína homóloga del organismo mesófilo *Bacillus subtilis* (*BsHPr*).

Metodología. Las simulaciones de DM se realizaron por triplicado a cinco diferentes temperaturas durante un lapso de tiempo de 1 μ s, conservando condiciones idénticas en ambas proteínas. Para ello se utilizó el programa GROMACS v2020.3 (3) y el campo de fuerza AMBER99SB (4). La solvatación se hizo con el modelo de agua explícito SPC/E y la neutralización a pH = 7.0 se realizó con NaCl. La Tabla 1 muestra las condiciones de simulación de las dos proteínas.

Tabla 1. Condiciones de simulación.

| Condición | <i>BstHPr</i> | <i>BsHPr</i> |
|----------------------------------|---------------|--------------|
| Volumen celda (nm ³) | 164.59 | 145.84 |
| Proteína (residuos) | 88 | 87 |
| Proteína (átomos) | 1,290 | 1,268 |
| Agua (átomos) | 15,084 | 13,131 |
| Iones (Cl ⁻) | 1 | 5 |
| Iones (Na ⁺) | 2 | 1 |

Los análisis estructurales y de las interacciones moleculares realizados fueron: perfiles de estructura secundaria, raíz de la desviación cuadrática media, radio de giro, fracción de contactos nativos, puentes de hidrógeno, área superficial accesible al solvente y puentes salinos.

Resultados. En este trabajo se encontró que las dos proteínas pierden estabilidad a medida que la temperatura aumenta, pero la estructura mesófila es la más afectada. La red de puentes salinos formada por la tríada de residuos Glu3-Lys62-Glu36 y el puente salino formado por el par de iones Asp79-Lys83 son interacciones clave que estabilizan a la proteína termófila, manteniendo el núcleo hidrófobo protegido y a la estructura compacta. Además, estas interacciones neutralizan la carga superficial negativa, causando que el potencial repulsivo disminuya, ya que funcionan como "grapas moleculares naturales" (Figura 1).

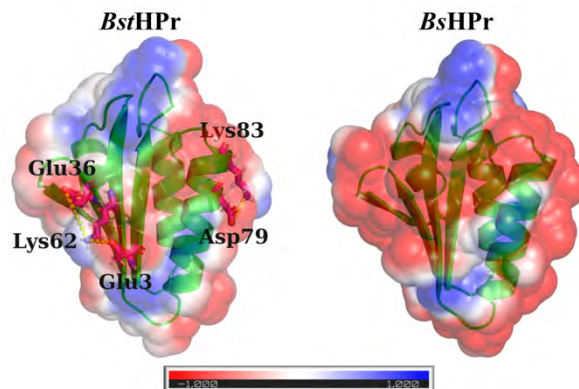


Fig. 1. Potencial electrostático superficial. Se muestran los puentes salinos esenciales en la estabilidad térmica de la proteína *BstHPr*.

Conclusiones. La red de puentes salinos Glu3-Lys62-Glu36 y el puente salino Asp79-Lys83 proporcionan estabilidad térmica a la proteína *BstHPr* del organismo termófilo *B. stearothermophilus* (5).

Agradecimiento. Se agradece el apoyo otorgado por CONAHCYT a través del proyecto A1-S-46202.

Bibliografía.

1. Razvi, A., Scholtz, J.M. (2006) *Protein Sci.* 15, 1569–1578.
2. Sridharan, S., Razvi, A., Scholtz, J.M., Sacchettini, J.C. (2005) *J. Mol. Biol.* 346, 919–931.
3. Abraham, M.J., et al. (2015) *SoftwareX*, 1–2, 19–25.
4. Hornak, V., et al. (2006) *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 65, 712–725
5. Gómez-Flores, A.K., López-Pérez, E., Alas-Guardado, S.J. (2023) *Int. J. Mol. Sci.* 24 (11), 9557.

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA BETALACTAMASA TLA-1 EN COMPLEJO CON TAZOBACTAM

César Alberto González Guzmán, Enrique Rudiño Piñera. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología / UNAM, Av. Universidad # 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C. P., 62210. enrique.rudino@ibt.unam.mx

Palabras clave: betalactamasas, cristalografía, tazobactam

Introducción. La gran capacidad de supervivencia de los microorganismos ha provocado que la humanidad se enfrente un gran reto: la resistencia microbiana. En México, se aisló una cepa multirresistente de *Escherichia coli* [1] que contiene la betalactamasa TLA-1, enzima capaz de degradar una amplia gama de antibióticos [2]. Se determinó la estructura de TLA-1 + ácido clavulánico, la cual, mostró dos intermediarios del inhibidor unidos en Ser70 y Ser237, fenómeno no reportado previamente [3]. Actualmente, no existen estructuras de TLA-1 silvestre con otros inhibidores frecuentemente utilizados como tazobactam, por lo que este proyecto se enfocó en obtener el modelo cristalográfico de TLA-1 + tazobactam y observar si existe el mismo comportamiento que con el ácido clavulánico.

Metodología. TLA-1 se expresó en una cepa de *E. coli* recombinante y se purificó por la técnica de cromatografía de intercambio iónico. TLA-1 se cristalizó por el método de gota sedente [3] y los cristales se remojaron con el inhibidor tazobactam. Posteriormente, se difractaron en la línea BL13-Xaloc (Alba) y se obtuvo un conjunto de datos que se procesó con diferentes programas (*Suite XDS, Phaser, Refmac5, Phenix, Coot*) para la obtención del modelo cristalográfico.

Resultados. Se determinó la estructura cristalográfica de TLA-1 + tazobactam (2.22 Å, $R_{work}=0.19$, $R_{free}=0.23$), modelando el intermediario *trans*-enamino acilado en Ser70.

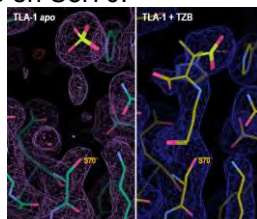


Figura 1. Mapas $2F_o-F_c$ (1σ) de TLA-1 «apo» (izquierda, PDB: 6NVT) y de TLA-1 en complejo con tazobactam (derecha).

Un hallazgo importante es la probable preferencia de los residuos Trp105, Arg132 y His170 por el grupo sulfato (*apo* PDB: 6NVT) o sulfonilo (TLA-1 + tazobactam). Sin embargo, los residuos se encuentran más cercanos al grupo sulfato (*apo*) que al grupo sulfonilo (TLA-1 + TZB), lo cual indicaría que las

interacciones son importantes solo para el reconocimiento ligante – receptor.

Sobre la Ser237, el único cúmulo de densidad electrónica se ajustó a una molécula de sulfato. Posiblemente el tazobactam no tenga afinidad sobre Ser237 o el sulfato presente en las condiciones de cristalización podría tener más afinidad hacia el segundo posible sitio activo que el tazobactam (pero no más que el ácido clavulánico). No obstante, los resultados de este trabajo no descartan la posibilidad de unión del tazobactam a la segunda serina catalítica, aunque es necesario explorar otras condiciones de cristalización que lo permitan.

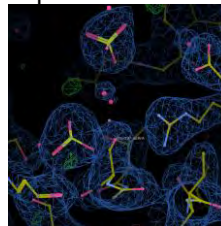


Figura 2. La ausencia de densidad electrónica ($2F_o-F_c = 1 \sigma$, $F_o-F_c = \pm 3.5 \sigma$) sobre el OG de Ser237 indica que no se aciló ninguna molécula de tazobactam sobre esta serina.

Conclusiones. Con los resultados de este proyecto se obtuvo el modelo cristalográfico del complejo de TLA-1 con tazobactam, en el que se observa el intermediario *trans*-enamino del tazobactam solamente en la posición vecina a la Ser70, y no en la vecindad de la Ser237.

Agradecimientos. A CONACyT por el apoyo económico durante mis estudios de maestría. A la línea XALOC BL13 del sincrotrón ALBA (Barcelona, España) por su invaluable aportación como fuente de rayos X, que facilitó la determinación de la estructura a una resolución adecuada para ver el ligante. Al Dr. Enrique Rudiño Piñera por el apoyo en la determinación del modelo estructural de TLA-1 en complejo con tazobactam, así como en las discusiones retroalimentaron el proyecto.

Bibliografía.

- [1] Silva, J., Aguilar, C., Becerra, Z., López-Antuñano F., & García, R. (1999) *Microb Drug Resist* 5(3), 189–193.
- [2] Silva, J., Aguilar, C., Ayala, G., Estrada, M. A., Garza-Ramos, U., Lara-Lemus, R., & Ledezma, L. (2000). *Antimicrob Agents Chemother* 44(4), 997–1003.
- [3] Cifuentes-Castro, V., Rodríguez-Almazán, C., Silva-Sánchez, J., & Rudiño-Piñera, E. (2020). *BBRC*, 522(2), 545–551.

BASES BIOFÍSICAS Y ESTRUCTURALES DE LA INTERACCIÓN IgE - PROFILINA

^aBenjamín García-Ramírez, ^aIsrael Mares-Mejía, ^aAnnia Rodríguez-Hernández, ^aPatricia Cano-Sánchez, ^bEnrique Ortega ^cAlfredo Torres-Larios†, & ^aAdela Rodríguez-Romero, ^aInstituto de Química, ^bInstituto de Investigaciones Biomédicas, ^cInstituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, 04510, México, benjamin.garcia.ramirez@live.com.

Palabras clave: IgE, alergia, alérgeno

Introducción.

Generamos un hibridoma de una IgE murina (2F5), que reconoce específicamente a la profilina de *Hevea brasiliensis* (Hev b 8). Esta IgE tiene una constante de asociación (K_a), medida por interferometría de biocapa (BLI), de $7.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Cuando se probó la IgE 2F5 con profilina de maíz (*Zea m 12*) no hubo reconocimiento, [1].

Metodología.

Producción y purificación de la IgE 2F5 [2].

Purificación del fragmento Fab/IgE 2F5.

Sobreexpresión y purificación de rHev b 8.

Cristalización del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8.

Cristalización del Fab/IgE 2F5.

Determinación de la estructura tridimensional del complejo Fab/IgE 2F5 con Hev b 8 por técnicas de difracción de rayos X.

Mutación, sobreexpresión y purificación de mutantes de *Zea m 12*.

Resultados.

Los estudios estructurales mostraron que el epítipo reconocido por la IgE 2F5 es conformacional y comprende tres regiones en la profilina. Estas regiones son los extremos amino y carboxilo terminales y un asa cercana a ambos extremos. Se observó que el reconocimiento entre el anticuerpo y la profilina es rígido debido a que no hay cambios en los CDRs del Fab después del reconocimiento. Al mismo tiempo, la alta afinidad de la IgE 2F5 por rHev b 8 se explica por las superficies perfectamente complementarias entre el parátipo y el epítipo (Fig. 1). Las interacciones más relevantes en el complejo Fab/IgE 2F5 y Hev b 8 son: tres puentes salinos, ocho interacciones hidrofóbicas, dos interacciones catión- π , una interacción aromática, múltiples puentes de hidrógeno e interacciones débiles (van der Waals y electrostáticas) [3].

También, se generó reactividad cruzada realizando las mutaciones E128D y G98N en la profilina de maíz, el reconocimiento fue del 50% comparado con el de rHev b 8. La mutación E128D eliminó un impedimento estérico, mientras que G98N estabilizó la interacción sobre la profilina de maíz [3].

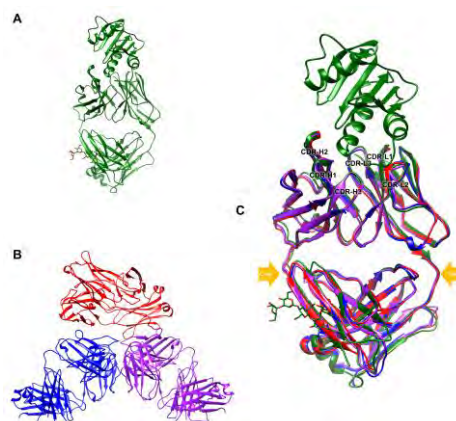


Fig. 1. Estructuras del complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 y el Fab libre. A. Complejo. B. Las tres moléculas del Fab/IgE 2F5 libres en la unidad asimétrica. C. Superposición de las tres moléculas del Fab/IgE 2F5 libre (rojo, azul y morado) con el complejo Fab/IgE 2F5-rHev b 8 (verde), en la parte superior se observa la profilina. Se muestran las regiones del codo y las CDR de la cadena pesada (H1, H2, H3) y de la cadena ligera (L1, L2, L3) (PDB ID: 7SBD y 7SD2) que no presentan cambios después del reconocimiento de rHev b 8.

Conclusiones.

La caracterización biofísica y estructural del Fab/IgE 2F5 (libre y en complejo con la profilina del árbol del hule) definen aspectos críticos de cómo la IgE 2F5, con sus cadenas ligera y pesada apareadas naturalmente, reconoce a la profilina del hule y cómo se da su reactividad cruzada al reconocer a una mutante de la profilina de maíz. Esto es relevante ya que se favorece el diseño y desarrollo de IgE humanizadas recombinantes para el diagnóstico y tratamiento de alergias.

Agradecimiento.

Al LANEM-IQ-UNAM. a Georgina Espinosa, a Jean Jaconcik y Vivian Stojanoff, del NSLS-II en el Laboratorio Nacional de Brookhaven. A la DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN207613 y IN208320.), al CONAHCyT (Grants 221169 and CF 2019—87163).

Bibliografía.

1. Mares-Mejía, I. *et al.* Sci. Rep. 6, 32552 (2016).
2. Haba, S., *et al.* (1991). J Immunol Methods, 138(1), 15-23.
3. García-Ramírez, B., *et al.* Commun Biol 5, 748 (2022)

SEMI-RATIONAL DESIGN OF A CYTOCHROME P450 BM3 LIBRARY FOR *p*-COUMARIC ACID HYDROXYLATION

Jesús Manuel López Meza, Leticia Olvera Rodríguez, Gloria Saab Rincón
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca,
62210. jesus.lopez@ibt.unam.mx

Palabras clave: P450, hydroxylation, coumaric acid

Introducción. La familia de citocromos P450 se caracterizan por catalizar reacciones de oxidación en enlaces C-H inertes, con alta regio- y estereoselectividad. Dentro de esta familia destaca el de *Bacillus megaterium* (P450BM3), por su alta expresión, solubilidad y autosuficiencia (1). Debido a esto, ha sido de interés para la ingeniería de proteínas logrando expandir su especificidad de sustrato más allá de los ácidos grasos de 12 a 20 carbonos (2). El objetivo principal de este proyecto fue diseñar una librería semi-racional de variantes del P450BM3 para cambiar la especificidad de sustrato hacia compuestos aromáticos como el ácido *p*-cumárico para la producción de ácido cafeico.

Metodología. Los residuos de aminoácidos seleccionados para el cambio de especificidad hacia el ácido *p*-cumárico se determinaron mediante el análisis de estructuras cristalográficas del P450BM3 y de acoplamiento molecular sobre el sitio activo. La construcción de la librería combinatoria se realizó mediante mutagénesis con base al protocolo de megaprimer-PCR (3). Se comparó la sensibilidad y rango lineal de dos métodos de tamizaje, los cuales fueron el ensayo de Folin y el ensayo de Fe(III)-FZ (4 y 5). El método de Fe(III)-FZ se empleó para el tamizaje de la librería construida.

Resultados. Se seleccionó un conjunto de siete residuos de aminoácidos en posiciones clave para el cambio de especificidad, que están involucrados en el canal de acceso al sitio activo y cercanos al grupo hemo (ver fig. 1). Se construyó una librería combinatoria sobre los residuos seleccionados, las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación del DNA (ver fig. 1). La librería final resultó en una diversidad de aproximadamente 20,000 variantes. Se requirió de una estrategia efectiva para identificar variantes dentro de la diversidad generada, por lo cual se estableció como método de tamizaje el ensayo de Fe(III)-FZ al mostrar un límite de detección menor (0.4mM) y un rango lineal de 0.4 a 4 mM de ácido cafeico, además de mostrar un cambio de tonalidad específico hacia el producto esperado. Con base en el método de Fe(III)-FZ se han sometido a tamizaje 2,500 variantes y se han logrado identificar y seleccionar

mutantes de interés con la finalidad de llevar a cabo su caracterización individual.

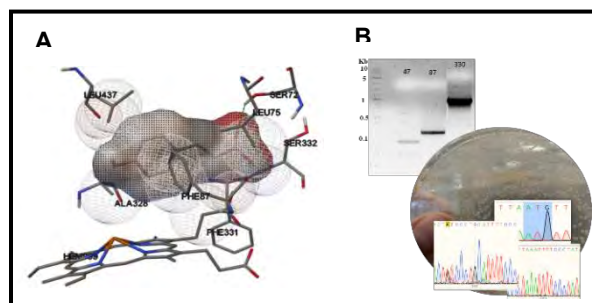


Fig. 1. A: Acoplamiento molecular del ácido *p*-cumárico sobre el sitio activo y residuos clave. B: Construcción de la librería de variantes.

Conclusiones. El diseño semi-racional resulta ser una estrategia efectiva para reducir el número de variantes a construir, en comparación con enfoques como PCR propensa a errores, en la que se generan millones de variantes. Por otra parte, se determinó que el ensayo de Fe(III)-FZ es adecuado para determinar la presencia específica del ácido cafeico dentro de una mezcla de compuestos. Se construyó una librería combinatoria de 20,000 variantes del P450BM3 en busca del cambio de especificidad hacia el ácido *p*-cumárico. Se han sometido a tamizaje 2,500 de las variantes obtenidas mediante el ensayo de Fe(III)-FZ. Se han seleccionado clonas que muestran consumo de NADPH sólo en presencia del sustrato ácido *p*-cumárico. Sin embargo, no se ha logrado identificar ácido cafeico producto. Los experimentos para la caracterización molecular del producto obtenido se están iniciando.

Agradecimiento. Este proyecto fue financiado por proyecto PAPIIT IN211020 e IN226623 a la Dra. Gloria Saab R. Programa de becas de posgrado del CONAHCYT, con número de becario 1146337.

Bibliografía.

- Ortiz de Montellano P. (2010). *Chemical reviews*, 110(2), 932-948.
- Whitehouse C, Bell S, Wong L. (2012). *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41: 1218-1260.
- Forloni M, Liu A. y Wajapeyee N. (2019). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6).
- Ainsworth E. y Gillespie K. (2007). *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- Berker K, Güçlü K, Demirata B y Apak R. (2010). *Analytical Methods*, 2(11), 1770-1778.

LA TETRASPANINA31 COMO POSIBLE RECEPTOR DE ADHESIÓN NEURONAL DE LA SUBUNIDAD β_2 DE LA Na^+/K^+ -ATPasa.

Christian Sosa¹, Marlet Martínez², Gema Lizbeth Ramírez², María Luisa Roldan¹, Liora Shoshani^{1,*}.

¹Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México 07360. ²Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México 11340. *Responsable del trabajo: liora.shoshani@gmail.com

Palabras clave: AMOG, Tetraspanina31, CAM

Introducción. La subunidad β_2 de la Na,K-ATPasa (AMOG) es una molécula de adhesión que participa en la interacción neurona-astrocito (1). En un modelo experimental de células CHO transfectadas, se demostró una interacción homotípica en *trans* para la función adhesiva; sin embargo, estudios en ratas adultas y humanos revelan la ausencia de β_2 /AMOG en neuronas maduras, lo que sugiere una interacción heterotípica neurona-astrocito. Por tanto, se busca el receptor neuronal de la β_2 /AMOG (2).

Hemos propuesto a la TSPAN31 como posible candidato ya que cumple con las características necesarias como ser proteína de membrana plasmática en neuronas y tener antecedentes de interacción con β_2 /AMOG por lo cual estudiaremos esta posibilidad.

Metodología. Para el análisis se utiliza un modelo 3D del ecto-dominio de β_2 /AMOG que ya ha sido usado en el laboratorio (2). El proyecto se divide en dos fases experimentales: A) Análisis *in silico*, en donde para obtener un complejo que describa la interacción TSPAN31- β_2 /AMOG se utilizan herramientas bioinformáticas (2, 3) y B) Análisis *in vitro* e *in vivo* con técnicas de adhesión en cultivos de líneas celulares, técnica de *Pull Down* en matriz de Ni y co-expresión observada por inmunofluorescencia para demostrar la interacción TSPAN31- β_2 /AMOG en un modelo que se asemeje a las condiciones fisiológicas (2, 3).

Resultados. Como se desconoce la estructura 3D de TSPAN31 se creó un modelo molecular utilizando AlphaFold (4) y se validó con programas de análisis estructural (5). Se modeló un complejo dimérico de TSPAN31 resultado del acoplamiento con HDOCK (Figura1), se validó el complejo con SDM (6), mostrando un complejo estable en su disposición, con respecto al tiempo y una disparidad entre la fluidez de la cadena A y B del complejo. El modelo dimérico de TSPAN31 se utilizará en *Docking* con el modelo de la β_2 /AMOG para obtener un complejo que simule la interacción célula-célula entre la neurona y astrocito.

Una vez con el complejo se realiza los Análisis *in vitro* e *in vivo*.

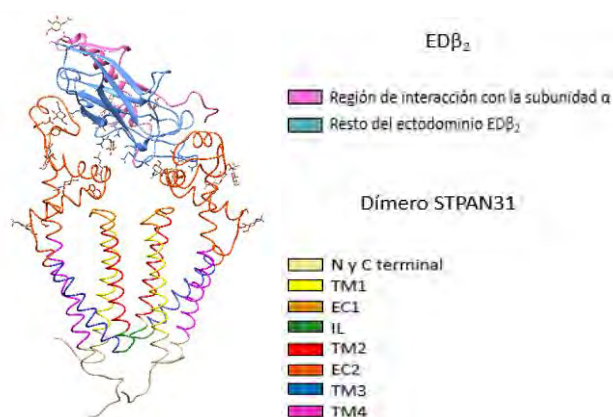


Fig. 1. Complejo dimérico en *cis* de TSPAN31 validado por SDM.

Conclusiones. Hemos conseguido un modelo dimérico de Tetraspanina31 con el cual podemos trabajar para conseguir un complejo con β_2 /AMOG que simule una interacción neurona-astrocito.

Agradecimiento. Agradezco al CONACYT por la beca de Doctorado (936226).

Bibliografía.

1. Antonicek H., Persohn E., Schachner M. (1987) *J Cell Biol.* 104(6):1587-1595.
2. Roldán M.L., Ramírez-Salinas G.L., Martínez-Archundia M., Cuellar-Perez F., Vilchis-Nestor C.A., Cancino-Díaz J.C., Shoshani L. (2022) *Int J Mol Sci.* 23(14):7753.
3. Páez O., Martínez-Archundia M., Villegas-Sepúlveda N., Roldán M.L., Correa-Basurto J., Shoshani L. (2019) *Int J Mol Sci.* 20(18):4538.
4. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Hassabis D. (2021) *Nature.* 596(7873):583-589.
5. Laskowski R., MacArthur M.W., Moss D.J., Thornton J.F. (1993) *J. Appl Crystallogr.* 26(2):136-148.
6. Scott W.G., Hünenberg P.H., Tironi I.G., Mark A.L., Billeter S.R., Fennen J., Torda A.E., Huber T., Kruger P., Van Gunsteren W.F. (1999) *J Phys Chem* 103(19):3596-3607.



VIII Congreso de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas

Tamizaje de variantes de α -amilasa con actividad alcohólica mejorada para la síntesis de alquil-glucósidos

Josahandy Jiménez-Peralta¹, Wendy Xolalpa-Villanueva¹, Leticia Olvera-Rodríguez¹, Humberto Flores-Soto¹ y Gloria Saab-Rincón¹

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca Morelos, 62210, josahandy.jimenez@ibt.unam.mx

Palabras clave: amilasa, alquil glucósidos, evolución dirigida

Introducción.

La enzima AmyA de *Thermotoga maritima* es una amilasa que hidroliza los enlaces glicosídicos α -1,4 del almidón a 85°C. Esta enzima sacarificante puede llevar a cabo reacciones de transferencia de glucosa a moléculas aceptoras diferentes al agua como carbohidratos (reacción de transglicosilación) o alcoholes (reacción de alcoholólisis) formando alquil glucósidos (AGs) con estos últimos. Los AGs son biosurfactantes utilizados en la industria como detergentes, espumantes, entre otras aplicaciones; tradicionalmente se producen mediante síntesis química, pero pueden ser producidos por medio de enzimas transglicosídicas.

En el laboratorio se ha buscado mejorar a AmyA mediante mutagénesis sitio dirigida logrando favorecer sus propiedades de transferencia con la variante H222Q. Sin embargo, el rendimiento obtenido sigue siendo bajo, por lo que se decidió utilizar la evolución dirigida para generar variantes más alcohólicas. La evolución dirigida se basa en los principios de evolución natural pero utiliza técnicas de laboratorio para dirigir el proceso de evolución. Inicia con la generación de diversidad en un gen aplicando mutagénesis aleatoria para generar bibliotecas del gen, seguida de la inducción de expresión de las variantes, para posteriormente elegir a las enzimas con propiedades mejoradas mediante un tamizaje o selección. Una limitante para aplicar la evolución dirigida en AmyA es contar con un método adecuado para detectar la capacidad alcohólica y la producción de AGs. Para ello se desarrolló un método basado en fluorescencia con 1-Anilino-naftaleno-8-Ácido sulfónico (ANS) que puede ser implementado en placas de 96 pozos para evaluar la capacidad de producción de AGs de las variantes de AmyA.

El objetivo del presente trabajo es identificar una o más variantes de la α -amilasa AmyA con mayor actividad alcohólica en comparación con la enzima silvestre utilizando el método de ANS.

Metodología.

A partir del gen silvestre de AmyA se generó una biblioteca de aproximadamente 2×10^3 variantes

mediante la reacción en cadena de la polimerasa propensa a errores (epPCR). Se hizo la inducción de las variantes con IPTG y se evaluó la actividad hidrolítica empleando la técnica de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS). También se realizó la reacción de alcoholólisis con butanol en placas de 96 pozos, y se implementó el método de fluorescencia con ANS para detectar los AGs; a mayor concentración de AGs mayor señal de fluorescencia.

Resultados.

Se han evaluado aproximadamente 300 variantes en 4 placas de 96 pozos por duplicado, a partir de las cuales se encontraron 2 candidatas con una mayor capacidad alcohólica. Una de ellas tuvo un incremento de aproximadamente 40 % y la otra del 87% en comparación con la enzima silvestre.

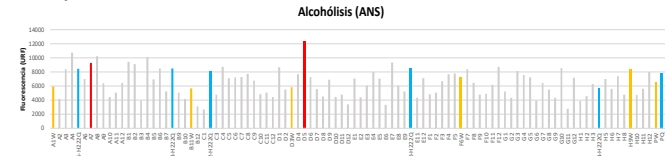


Fig. 1. Comparación de 86 variantes evaluadas por el método de fluorescencia con ANS

Conclusiones Preliminares.

Se encontraron 2 variantes aparentemente más alcohólicas que la enzima silvestre. A pesar de la complejidad de la mezcla del almidón, alcohol y proteínas del lisado, el método con ANS demostró ser adecuado para la identificación de las variantes potenciales, aunque todavía puede ser optimizado.

Agradecimiento.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IN226623 otorgado a GSR y PAPIIT IA202619 a WX.

Bibliografía.

1. Damían-Almaz, J., Moreno, A., López-Munguía, A., Soberón, A., Gonzáles-Muñoz, F., Saab-Rincón, G. (2008). *Applied and environmental microbiology*. 74 (16): 5168-5177.
2. Zeymer, C., Hilvert, D. (2018). *Annual Review of Biochemistry*, 87: 11.1-11.27.

CONSTRUCCIÓN DE UNA PROTEÍNA DE UNIÓN A ENDOXIFENO CON ALTA AFINIDAD Y SELECTIVIDAD

Emma L. Arévalo-Salina¹, Takuya Nishigaki,² Wendy Xolalpa¹, Leticia Olvera¹ y Gloria Saab Rincón¹.

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología. ² Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa 62210 Cuernavaca, Morelos, México. emma.arevalo@ibt.unam.mx

Palabras clave: Rediseño, selectividad, unión

Introducción. El tamoxifeno es un profármaco utilizado en la terapia hormonal contra el cáncer de mama, el cuál es transformado por el hígado, generando entre otros metabolitos, el 4-hidroxi-N-demetiltamoxifeno (endoxifeno) el principal principio activo. La respuesta al tratamiento muestra una gran variación, debido a diferencias en la concentración de endoxifeno. Para mantener a este metabolito en un rango terapéutico, se ha propuesto monitorear las concentraciones en sangre mediante el uso de biosensores¹. Estos dispositivos utilizan un elemento biológico para el reconocimiento de una molécula diana.

El objetivo de este trabajo es obtener una proteína de alta afinidad y selectividad para unirse al endoxifeno que sirva de base para la construcción de un biosensor². Para la obtención de la molécula deseada se rediseñó el dominio de unión a ligando (LBD) del receptor de estrógeno alfa (ER α), que posee afinidad alta hacia el endoxifeno, pero promiscuidad hacia una gran variedad de compuestos. Esto último limita su uso como posible molécula de reconocimiento en el desarrollo de biosensores.

Metodología. El rediseño del LBD se llevó cabo usando el software Rosetta y el protocolo⁴ se basó en optimizar la unión del endoxifeno, mientras se disminuye hacia los estrógenos naturales. Las variantes construidas, se expresaron en la cepa de *E. coli* BL21 y se purificaron mediante cromatografía de afinidad. El análisis de unión se llevó a cabo mediante anisotropía de fluorescencia usando el fitoestrógeno fluorescente coumestrol como reportero, cuya interacción con el LBD es semejante a la del estradiol (E2), el principal estrógeno encontrado en sangre.

Resultados. Se generaron y analizaron 40 000 modelos, en los cuales se observaron cambios constantes en las posiciones H524/L525. Se construyeron 4 variantes dobles en estas posiciones y una variante triple. El análisis de unión reveló que

dichas mutaciones modificaron la unión en todos los casos, siendo letal en el caso de la triple variante, cuya expresión y purificación no fue posible llevarla a cabo. La posición 524 forma un puente de hidrógeno con el estradiol (el principal estrógeno encontrado en sangre) y con coumestrol, pero no con el endoxifeno, de manera que este cambio parece haber sido el responsable de la disminución de la unión con nuestro reportero coumestrol.

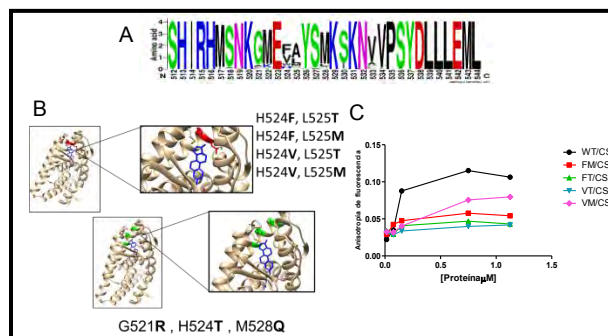


Fig. 1. A) Alineamiento de secuencias de modelos generados. Se observan cambios constantes en las posiciones 524/525. B) Construcciones dobles y triples C. Gráfico de interacción de la proteína WT y las variantes con coumestrol (20 nM).

Conclusiones. Las modificaciones en las posiciones 524 y 525 modificaron la unión del LBD, afectando la unión al coumestrol. Previamente se reportó que cambios en la posición 525, inhibían la unión de los ligandos. Encontramos que la sustitución de este residuo en conjunto con la posición 524, no elimina la unión de ligandos, pero si modifica su selectividad. Es necesario aún definir la afinidad con el E2.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por los proyectos PAPIIT IN211020 e IN226623, CONACyT 316520 y la beca CONAHcyT 594443.

Bibliografía. 1 Hoskins, J. M., Carey, L. A. & McLeod, H. L. *Nature reviews. (2009) Cancer.* 9, 576-586. 2 Fox, P. et al. (2016) *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 22, 3164-3171. 3 Moretti, R., Bender, B. J., Allison, B. & Meiler, J. (2016) *Methods Mol Biol.* 1414, 47-62. 4 Pakdel, F., Reese, J. C. & Katzenellenbogen, B. S. (1993) *Mol Endocrinol.* 7, 1408-1417.

**DIFERENCIAS ESTRUCTURALES EN LAS ISOENZIMAS DE LA LDH DEL CAMARON
*P. VANNAMEI***

Magally Hernandez Palomares, Gloria Yepiz Plascencia y Elisa Valenzuela Soto
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., G.E. Astiazarán Rosas, #46, col
La Victoria, Hermosillo, Sonora, C.P. 83304, México. magallyhdezp@gmail.com

Palabras clave: LDH, camarón, vannamei

Introducción. La enzima lactato deshidrogenasa es crucial en la glucólisis anaerobia (1). Además, es importante en la respuesta a hipoxia e infecciones en los crustáceos (2,3). En el camarón *P. vannamei* se ha reportado la existencia de un solo gen para la LDH y que por splicing alternativo se generan la LDH-1 y LDH-2. Las cuales tienen un tamaño de 332 aminoácidos con tan solo 15 aminoácidos diferentes entre las dos LDHs (2).

El objetivo de este trabajo fue estudiar las características y diferencias en la estructura de las proteínas recombinantes LDH-1 y LDH-2.

Metodología. Para obtener el modelo del homotetramero de cada proteína se utilizó el software MOE v2018.10. Mediante el programa Phyre2 se analizó la estructura para obtener características funcionales de cada LDH y con el programa PSIPRED se predijo la estructura secundaria de la LDH-1 y LDH-2.

Resultados. Se obtuvo el modelo del homotetramero de cada una de las proteínas, en el modelo se analizaron los 15 aminoácidos diferentes entre las LDHs y se observó que tienen orientación diferente en el espacio (Fig. 1).

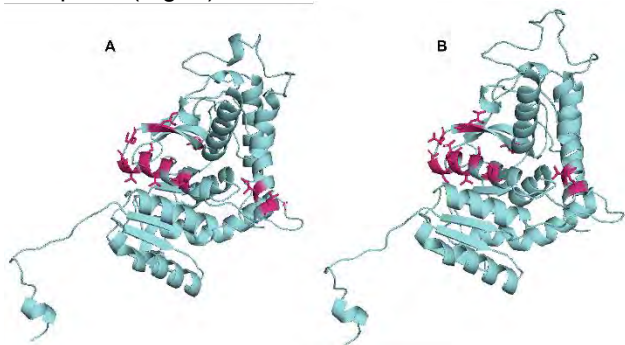


Fig. 1. Representación de los 15 aminoácidos diferentes en las LDHs. LDH-1(A) y LDH-2 (B)

Se identificaron los aminoácidos catalíticos, los cuales son el ácido aspártico 166 (D166), arginina 169 (R169) e histidina 193 (H193) que de acuerdo con el programa se identificaron los aminoácidos en la interfase proteína-

proteína los cuales son similares con sustituciones de la misma naturaleza química. Sin embargo, se encontraron diferencias en los aminoácidos que conforman el sitio activo (Fig.2). En donde se observó que en el de la LDH-2 hay un número mayor de aminoácidos y que esta extendido en comparación con la LDH-1 (Fig. 2).

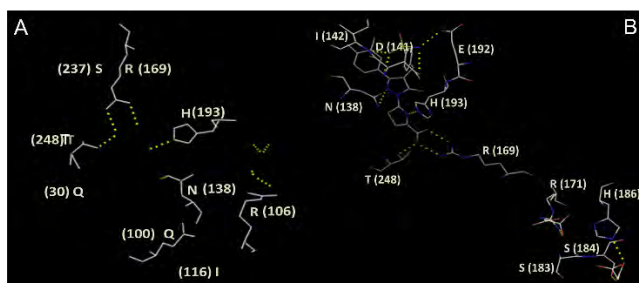


Fig. 2. Aminoácidos que conforman el sitio activo de la LDH-1(A) y LDH-2 (B)

Los análisis de la estructura secundaria muestran que en la LDH-1 hay un mayor porcentaje de hélices alfa y rizos que en la LDH-2, por otro lado, en la LDH-2 se encontró un mayor porcentaje de hojas beta respecto a las encontradas en la LDH-1. Estas diferencias estructurales entre las dos isoenzimas, al parecer estar contribuyendo a las diferencias bioquímicas previamente detectadas y a las diferencias en su regulación por sustrato [4,5].

Conclusiones. Las proteínas LDH-1 y LDH-2 presentan cambios en la estructura secundaria y terciaria

Agradecimiento. A CONAHCYT por el apoyo durante el posgrado de Magally Hernandez.

Bibliografía.

- Rose I. and Rose Z., 2014. *Comprehensive biochem* 17, 93-161.
- Soñanez J., Rodriguez M., Leal B., Peregrino A., Gómez S. and Yepiz G. 2012. *Biochimie*, 94(5): 1250-1260.
- Hernández M., Godoy J., Gómez S., Gámez L., Ortiz R., Muñoz J. and Soñanez J. 2018. *Fish and shellfish immunology*. 74, 401-409.
- Fregoso A., Valenzuela E., Figueroa C., Peregrino A., Ochoa M., Leyva L., and Yepiz G. 2017. *Protein expression and purification*, 137, 20-25.
- Leyva L., Hernandez M., Valenzuela E., Figueroa C., Yepiz G. 2019. *Protein Expression and Purification*, 164, 105461.

TRANSGLICOSILACIÓN ENZIMÁTICA DE LA SACAROSA EN MEZCLAS EUTÉCTICAS

César Iván González-Hernández, Carmina Montiel-Pacheco. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, cesar_igh@hotmail.com

Inulinasa, Mezclas eutécticas, Fructooligosacáridos

Introducción. La importancia de la producción de fructooligosacáridos (FOS) radica en que, por su estructura química, no son degradados en el estómago, debido a la propiedad dada por el tipo de enlace β -(2-1) y el tamaño (4-5 unidades de fructosa) con ello pueden llegar al intestino grueso y a partes distales del intestino delgado, ayudando a la proliferación de grupos de bacterias benéficas para el organismo (Silva et al., 2013). En el proyecto se buscó la síntesis enzimática de FOS, esto a partir de la sacarosa como sustrato en la reacción y el uso de un medio no convencional, una mezcla eutéctica de bajo punto de fusión (DES). Se empleó la inulinasa comercial, Novozyme 960® de origen fúngico como biocatalizador. El objetivo fue establecer un medio de reacción no convencional y sus condiciones mediante el uso de mezclas eutécticas a fin de llevar a cabo una reacción de transglucosilación enzimática para la obtención de un producto de valor agregado.

Metodología. Se prepararon mezclas eutécticas como describen (Zhekenov et al., 2017). En las cuales se probó la estabilidad enzimática de la enzima comercial Novozymes 960® a diferentes temperaturas y tiempos de permanencia por medio del ensayo de DNS. Se realizó la transfructosilación enzimática en el medio ChCl – glicerol (DES) con 30% de buffer de acetatos pH 5 a 50 °C, durante 30 min, con sacarosa sustrato al 10%. Se analizaron los productos obtenidos por TLC y HPACD-PAD.

Resultados. La inulinasa Novo 960® mostró ser estable en las mezclas eutécticas manteniendo su actividad hasta por 30 h a 40 °C (Fig 1) y hasta 28 días a temperatura ambiente.

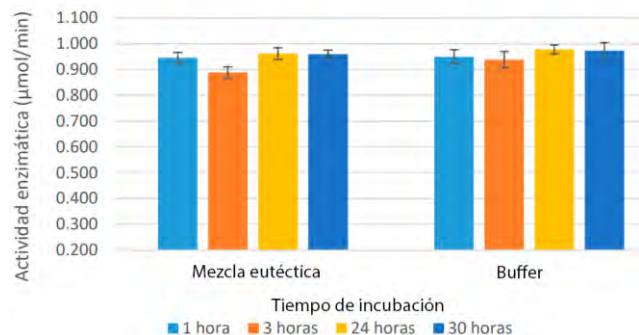


Fig. 1. Estabilidad en buffer y ChCl – glicerol con 30% buffer.

Medida por hidrólisis de sacarosa al 1%. Condiciones a 50 °C, pH 5, 30 min.

Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de transfructosilación en DES, observándose una mejor producción de FOS comparado con un medio de reacción acuoso (Fig 2).

Los productos de la reacción se identificaron mediante la cromatografía HPACD-PAD, los cuales fueron principalmente 1-kestosa, neokestosa, blastosa, inulobiosa, 1,6-nistosa y 6-neonistosa (Fig. 2).

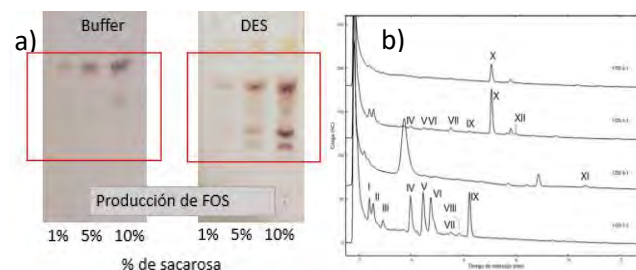


Fig. 2. a) Diferencia en la producción de FOS en los rectángulos rojos comparado el medio en buffer y ChCl – glicerol. Condiciones a 50 °C, pH 5, 30 min. b) HPACD-PAD de los productos obtenidos I. glucosa, II. fructosa, III. sacarosa, IV. 1-kestosa, V. blastosa, VI. inulobiosa, VII. 6-kestosa, VIII. levánobiosa, IX. neokestosa, X. 1,6-nistosa, XI. 6- neo-nistosa, XII. Inulotriosa.

Conclusiones. En DES añadir 10% de agua, se refleja en pasar de una actividad residual de 2.1% a una de 95.5% a los 7 días de exposición y a 30% tener una estabilidad similar al medio buffer. La producción de FOS por seguimiento en TLC es mejor en la mezcla eutéctica cloruro de colina – glicerol que en medio acuoso a bajas concentraciones de sacarosa (5% y 10%). Los productos obtenidos en la reacción de transfructosilación en medio eutéctico tienen hasta 4 grados de polimerización (Fig. 2).

Agradecimiento. Agradecimiento a Conahcyt por la beca recibida. A DGAPA por el financiamiento PAPIIT del proyecto IN214123.

Bibliografía. 1. Silva, M. F., Rigo, D., Mossi, V., Golunski, S., De Oliveira Kuhn, G., Di Luccio, M., Dallago, R., De Oliveira, D., Oliveira, J. V., & Treichel, H. (2013). Food Chemistry, 138(1), 148–153. 2. Zhekenov, T., Toksanbayev, N., Kazakbayeva, Z., Shah, D., & Mjalli, F. S. (2017). Fluid Phase Equilibria, 441, 43–48.

CARACTERIZACIÓN DE LA LEVANASA RECOMBINANTE DE *BACILLUS VELEZENSIS*

Vania Villalobos Figueroa, Carmina Montiel Pacheco, Facultad de química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, CDMX 04510, 316243111@quimica.unam.mx

Palabras clave: Levanasa, caracterización bioquímica, modelado por homología

Introducción. Las hojas de agave están compuestas además de celulosa, lignina y hemicelulosa, de inulina, un polisacárido de fructosa unido por enlaces β -(2,1) y β -(2,6) que al hidrolizarse produce oligómeros llamados fructooligosacáridos (FOS) que funcionan como prebióticos (1). La inulina de agave o agavina es una molécula altamente ramificada que no puede ser hidrolizada completamente por enzimas comerciales que si son capaces de hidrolizar a la inulina de achicoria. Por tal razón, y ante la necesidad de poder aprovechar la agavina presente en las hojas del agave, nuestro grupo de investigación se dio a la tarea de aislar microorganismos provenientes del bagazo de agave capaces de usar a la agavina como única fuente de carbono. De esta tarea se aisló la bacteria *Bacillus velezensis* capaz de producir tres enzimas glicosilhidrolasas (GH), las cuales hidrolizan los enlaces glicosídicos β -2,6 y β -2,1 de la agavina: una inulinasa, una levansacarasa y una levanasa. Sin embargo, la cantidad de enzima obtenida del microorganismo es muy baja, lo que impide el análisis y la caracterización de estas. Es este trabajo se clonó, expresó y purificó la levanasa recombinante de *B. velezensis*.

Metodología. Se amplificó el gen de interés usando cebadores para posteriormente ligar este producto al plásmido pET28b+. Se transformaron células de *E. coli* BL21-DE3 que fueron inducidas durante 24 horas a diferentes condiciones (temperatura y concentración de IPTG). Una vez inducida la proteína se purificó usando una columna de afinidad y se cuantificó la actividad enzimática usando como sustratos sacarosa, inulina, agavina y levano. Por otro lado, se construyó un modelo de la levanasa usando el servidor de Swiss-model.

Resultados. Se amplificó el gen de la levanasa, con un tamaño de 1545pb(2) y se introdujo en pET28b(+) para posteriormente transformar células de *E.coli* DH5 α y BL21-DE3. Se confirmó la presencia del gen de interés dentro de las células con ayuda de una PCR de colonia. Se prosiguió con la expresión de la proteína, que posee un peso molecular de 65 kDa (2). Como

se observa en la **Fig.1A**, se monitoreo la cinética de expresión durante 24 h y se encontró que a las seis horas tiene la máxima expresión.

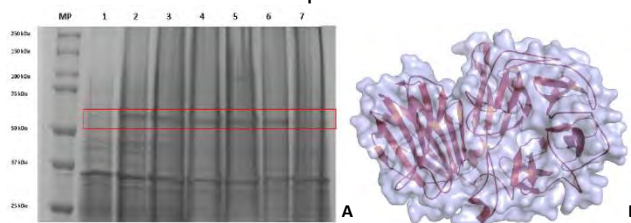


Fig. 1a. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% de la inducción de la levanasa tomada a una concentración de IPTG de 0.13 mM a 20°C. Marcador de peso molecular (MP), tiempo cero (1), 1h de inducción (2), 2h de inducción (3), 3h de inducción (4), 4h de inducción (5), 6h de inducción (6) y 24h de inducción (7).// **b.** Modelo construido por homología de la levanasa, *B. velezensis*.

Finalmente se purificó la levanasa por cromatografía de afinidad, una vez purificada se realizaron ensayos de actividad enzimática de la proteína con diferentes sustratos, mostrados en la **Tabla 1**. Por otro lado, se realizó un modelado por homología a partir de la secuencia de aminoácidos con ayuda del servidor Swiss-model, mostrado en la **Fig. 1B**

Tabla 1 . Actividad enzimática de la Levanasa frente a sus 4 sustratos

| | Sacarosa | Levano | Inulina | Agavina |
|----------------------|-------------|-----------|----------|----------|
| Levanasa (U/mg prot) | 0.13± 0.07. | 12± 0.06. | 12±0.06. | 11± 0.08 |

Conclusiones. Tomando en cuenta los resultados anteriores se determinaron los mejores parámetros de inducción de la levanasa los cuales fueron: densidad inicial de 0.6, 0.13 mM de IPTG a 20°C durante 6 horas de inducción.

Por último, la levanasa presentó actividad enzimática a pH=5 y 50°C frente a los diferentes sustratos probados siendo la sacarosa el sustrato con el que posee mayor actividad.

Agradecimiento. DGAPA PAPIIT IN214123

Bibliografía.

- Montañez J., Venegas J, Vivar M, Ramos E. (2011). *Bioagro*, 23(3), pp. 199-206.
- Abad, A. (2022). Producción y caracterización de una fructosilhidrolasa de *Bacillus amyloliquefaciens* 12GeP recombinante. Universidad Nacional Autónoma de México.

Diseño de enzimas desubiquitininas quiméricas con preferencia por cadenas homotípicas de ubiquitina K63

Leonardo I. Morales-Lino¹, Fidel O. Ramírez-Amador¹, Luis E. Pérez-Córdova¹, Leticia Olvera-Rodríguez¹, Alexey Llopiz¹, Manuel S. Rodríguez², Gloria Saab-Rincón¹, Wendy Xolalpa-Villanueva¹.

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, 62250 Cuernavaca, Morelos, México. ²Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) - UPR 8241 CNRS, and UMR 152 Pharma-Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, 31400 Toulouse, France, leonardo.morales@ibt.unam.mx

Palabras clave: Desubiquitinasa, ubiquitina, dinámica molecular.

Introducción. Las desubiquitininas (DUBs) son enzimas que regulan la ubiquitinación al hidrolizar el enlace formado entre una ubiquitina (Ub) y la proteína blanco o una Ub y otra Ub. Las uniones Ub-Ub pueden formarse a través de las lisinas presentes generando cadenas con topologías distintas (1). Las cadenas unidas por medio de la lisina 63 (K63) tienen un papel importante en funciones independientes del proteasoma como la transducción de señales, la reparación del ADN o la autofagia. La mayoría de las DUBs reportadas, como la USP2 (Ubiquitin Specific Protease 2), pueden reconocer varios tipos de cadenas; sin embargo, existen algunas que actúan preferencialmente sobre un tipo de cadena o topología, como CYLD (Cylindromatosis), AMSH y AMSHLP que reconocen cadenas K63. La identificación de los determinantes estructurales que intervienen en el reconocimiento de las cadenas de poliubiquitina en las DUBs es importante para poder explotar su potencial como herramientas para la construcción de moléculas sintéticas que ayuden a controlar las proteínas desreguladas. El objetivo de este trabajo es identificar los elementos estructurales relevantes para el reconocimiento de las cadenas de poli-Ub K63 y transferirlos a una DUB promiscua de la misma familia.

Metodología. Se realizaron alineamientos estructurales de los cristales de CYLD (PDB 2VHF) y AMSHLP (PDB 2ZNV) en complejo con di-Ub utilizando Pymol. Se corrieron dinámicas moleculares (MD) en GROMACS y se compararon con las de enzimas sin preferencia por cadenas K63. Con las regiones identificadas, se diseñaron quimeras entre USP2 y CYLD y se modelaron con AlphaFold2. Las construcciones se expresaron de forma recombinante en *E. coli*, y se purificaron por cromatografía de afinidad. Se evaluó la actividad con sustratos basados en

fluoróforos internamente apagados (Internally Quenched Fluorescent).

Resultados. Los alineamientos estructurales revelaron que las DUBs con preferencia por cadenas K63 acomodan a la di-Ub de manera similar. La dinámica molecular de CYLD reveló que las 3 estructuras (BL1, BL2 y L3), reportadas previamente (2), son importantes en el reconocimiento de las cadenas. El asa L3 parece estabilizar a la ubiquitina proximal. Al comparar estructuralmente a CYLD con DUBs de la misma familia sin preferencia por cadenas K63 (USP2 y USP14), se encontró que las regiones descritas están presentes pero difieren en longitud, siendo más largo el L3 en CYLD. Para evaluar el papel de esas regiones se están construyendo quimeras de la enzima USP2 con las asas de CYLD. En este trabajo, se caracterizó de forma preliminar la quimera USP2+L3, la que disminuyó su actividad con cadenas K48 pero mantuvo el reconocimiento hacia cadenas K63.

Conclusiones. Las interacciones entre las DUBs y la di-Ub son claves para el reconocimiento de las cadenas. El asa flexible L3 de CYLD parece estabilizar la di-Ub favoreciendo el reconocimiento de cadenas K63. L3 puede ser transferido a otras DUBs de la misma familia modificando el reconocimiento de las cadenas K63.

Agradecimiento. Proyecto apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación CONAHCyT A1-S-22895.

Bibliografía.

- Gonzalez-Santamarta, M., Bouvier, C., Rodriguez, M. S. & Xolalpa, W. (2022). Seminars in Cell & Developmental Biology 132, 155–170.
- Komander, D. et al. (2008). Molecular Cell. Vol (29), 451–464

OPTIMIZACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LA PROTEÍNA AsCas12a EN *Escherichia coli*

Orlando-Gómez; Melissa-Morales; Erick-Valdez; Armando-Hernández, Instituto de Química UNAM, Ciudad de México 04510, armandohg@iquimica.unam.mx.

Palabras clave: Biosíntesis, CRISPR-Cas12a, *E. coli*

Introducción. La proteína Cas12a proveniente de *Acidaminococcus sp* ha llamado la atención de la comunidad científica gracias a los usos que presenta y por la actividad de corte colateral que la diferencia de otras proteínas Cas. La biosíntesis de un homólogo (FnCas12a) en *E. coli*, así como su purificación fueron descritas por Mohanraju y colaboradores en 2018 con condiciones estándar, esto representa una gran oportunidad de investigación para trabajar con AsCas12a y encontrar los valores óptimos para su biosíntesis.

Objetivo: Optimizar los parámetros fisicoquímicos y biológicos relacionados con la biosíntesis de AsCas12a

Metodología. Siguiendo el protocolo de Mohanraju, se realizó un diseño experimental a escala usando 100 mL de cultivo que permitiera probar diversas condiciones tales como: temperatura de inducción y post-inducción, tiempo de post-inducción, concentración de IPTG (mM), medio empleado, cepa y la adición de glucosa al medio (1%). Posterior a esto se realizaron ensayos SDS-PAGE, así como análisis densitométricos para determinar las condiciones óptimas según la intensidad de la banda perteneciente a AsCas12a.

Resultados. Se analizaron concentraciones mM de IPTG (0.3, 0.6, 1, 1.3 y 1.6) manteniendo constantes el resto de los parámetros establecidos en la literatura.

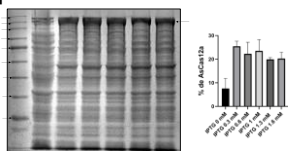


Fig. 1. Ensayo SDS-PAGE para la determinación de la concentración (mM) óptima de IPTG en *E. coli* BL21DE3 a 12°C por 24 hrs

Posteriormente una cinética de producción se llevó a cabo para determinar el tiempo de post-inducción en el cual se observe un aumento de la presencia de la proteína de interés.

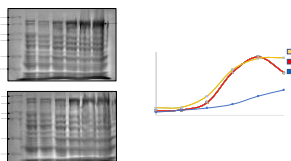


Fig. 2. Ensayo SDS-PAGE 7.5% para evaluar la cinética de la biosíntesis AsCas12a en *E. coli* BL21DE3.

Al observar un aumento en el % de AsCas12a a las 9hrs de la inducción se determinó dicho tiempo para los ensayos posteriores tales como temperatura, medio de cultivo y cepa

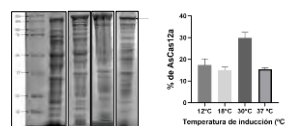


Fig. 3. Ensayo SDS-PAGE 10% para la determinación de la temperatura de post-inducción.

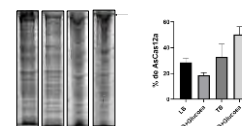


Fig. 4. Ensayo SDS-PAGE 10% para la determinación del medio de cultivo y el efecto del 1% de glucosa.

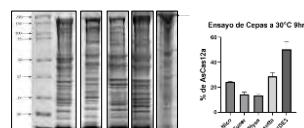


Fig. 5. Ensayo SDS-PAGE 10% para la determinación del medio de la cepa de *E. coli*.

Finalmente se llevó a cabo un ensayo de producción y purificación por cromatografías de columna de un litro de cultivo con las condiciones optimizadas y para comprobar la actividad catalítica de la proteína se realizó un ensayo de detección genética de *T. cruzi*.

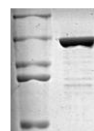


Fig. 6. Análisis de la pureza de la proteína AsCas12a biosintetizada con las condiciones optimizadas.

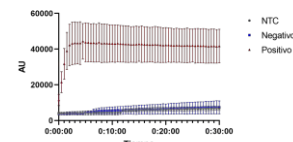


Fig. 6. Ensayo de detección genética de DNA de *T. cruzi*

Conclusiones. Con las condiciones optimizadas se obtuvieron 13.6 mg/L de AsCas12a funcional en 9hrs, lo cual resulta en un mejor rendimiento comparado con los 10 mg/L obtenidos con el protocolo original en 24hrs

Agradecimiento. Proyecto financiado por **DGAPA-PAPIIT (IV200820)** y por la Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (**AMEXCID**)—Secretaría de Relaciones Exteriores de México (**Proyectos COVID-19**).

Bibliografía.

1. Bijoya P, Guillermo M. (2020) *Biomed. J.* Vol (43): 8-17.
2. Carmignotto, G. P., & Azzoni, A. R. (2019). *J. Biotechnol* Vol (306): 62-70.
3. Mohanraju, P., Van Der Oost, J., Jinek, M., & Swarts, D. C. (2018). *Bio-protoc* Vol (5) 9.

ESTUDIO DE DOS METALOTIONEÍNAS DEL HONGO AMBROSIAL Y FITOPATÓGENO, *Fusarium kuroshium*.

Mónica Janett Muñoz Contreras¹, Rogelio Rodríguez Sotres², Eliel Ruiz May¹, Diana Sánchez Rangel^{1,3}, Eric Edmundo Hernández Domínguez^{1,3}

¹Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Veracruz, México ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México ³Investigador por México-CONAHCYT

eric.hernandez@inecol.mx

Carretera antigua a Coatepec 351 Col. El Haya, Xalapa, Veracruz. CP 91073 Tel: (228) 8421800 Ext. 3616

Palabras clave: metalotioneínas, Fusarium, cisteína.

Introducción. Las metalotioneínas (MTs) son una familia de proteínas ubicuas y muy diversas, con alta afinidad a Zn²⁺, Cu⁺ y otros metales, gracias a motivos como CXC, CXXC, CC y otros (C, CYS; X, otro aminoácido). Las MTs participan en la homeostasis de metales, tolerancia a metales pesados y protección ante estrés oxidativo, entre otras funciones⁽¹⁾. Un análisis transcriptómico de *Fusarium kuroshium*⁽²⁾ identificó 2 posibles MTs: FkMet1 y FkMet2. *F. kuroshium* es un hongo fitopatógeno utilizado como alimento por el escarabajo ambrosial *Euwallacea kuroshio*. En México, se detectó su presencia desde el 2016⁽³⁾ y representa una amenaza a más de 300 especies vegetales de interés forestal y agrícola⁽⁴⁾. Las MTs pueden tener una participación en la virulencia de hongos, pero se desconoce su relación con la patogénesis.

Con el objetivo de aportar datos sobre la función de las MTs en *F. kuroshium*, se buscó producir a FkMet2, en un sistema heterólogo, para evaluar algunos parámetros fisicoquímicos. Además, se predijo la estructura tridimensional de FkMet1 y FkMet2 y se analizó su dinámica molecular (MD).

Metodología. La secuencia de aminoácidos de FkMet1 y FkMet2 se analizó con herramientas bioinformáticas buscando su posible péptido señal, localización subcelular, composición de aminoácidos y estructura secundaria. La estructura 3D de las MTs se predijo in silico. Los modelos se calificaron con el protocolo Rd.HMM⁽⁵⁾ y se simuló su MD. Además, la secuencia codificante de FkMet2 se ligó al vector de expresión pET28a y se usó para transformar células *E. coli* Shuffle® T7.

Resultados. FkMet1 parece una proteína de 52.4 kDa, con un 8.9% de cisteína, con un péptido señal y ubicación extracelular. En

contraste, FkMet2 parece ser intracelular, sin péptido señal, con 14.4% de cisteína y de 11.1 kDa (Fig.1).

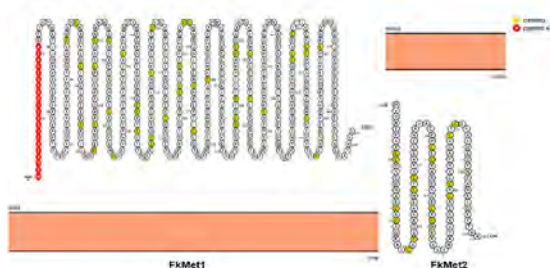


Fig. 1. Metalotioneínas de *F. kuroshium*. FkMet1 tiene péptido señal (rojo) y ubicación extracelular. FkMet2 ubicación intracelular. Ambas son ricas en cisteína (amarillo).

Los puntajes Rd.HMM para FkMet1 y FkMet2 muestran que los modelos 3D representan una buena aproximación a la conformación tipo cristalina. FkMet2 se produjo en células *E. coli* Shuffle® T7 con un rendimiento aproximado de 1mg/L.

Conclusiones. FkMet1 y FkMet2 son potenciales metalotioneínas, ricas en cisteína. FkMet2 puede ser producida en un sistema heterólogo.

Agradecimiento. Beca CONAHCYT de Doctorado. Fondo presupuestario F003, proyecto 292399.

Bibliografía.

1. Capdevila M, Bofill R, Palacios Ò, Atrian S. *Coord. Chem. Rev.* (2012) 256(1):46–62.
2. Sánchez-Rangel D, Hernández-Domínguez EE, Pérez-Torres CA, Ortiz-Castro R, Villafán E, Rodríguez-Haas B, et al. *BMC Genom.* (2018) 19:721.
3. García-Avila CDJ, Trujillo-Arriaga FJ, López-Buenfil JA, González-Gómez R, Carrillo D, Cruz LF, et al. *Fla. Entomol.* (2016) 99(3):555–6.
4. Eskalen A, Stouthamer R, Lynch SC, Rugman-Jones PF, Twizeyimana M, Gonzalez A, et al. *Plant. Dis.* (2013) 97(7):938–51.
5. Martínez-Castilla LP, Rodríguez-Sotres R. *PLoS One* (2010) 5(9):e12483.

DESARROLLO DE BIONANOESTRUCTURAS CON DNA Y PROTEÍNAS CRISPR-Cas

Jesús Ortiz Saucedo & Armando Hernández García, Instituto de Química, Departamento de Química de Biomacromoléculas, Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología, UNAM. Ciudad de México, CP. 04510, armandohg@iquimica.unam.mx

Palabras clave: Bionanotecnología, CRISPR-Cas, nanofibras

Introducción. En la naturaleza, el DNA es la molécula universal para el almacenamiento de la información genética, mientras que en el mundo sintético el DNA se ha usado como un bloque de construcción empleado para desarrollar arquitecturas en la nanoescala (1). Esta molécula es altamente versátil y programable, permitiendo el diseño racional de nanoarquitecturas con gran precisión. El alcance de las nanoestructuras de DNA puede ser expandido con la incorporación de proteínas, dando lugar a bionanoestructuras híbridas. Este proyecto está enfocado en la bionanotecnología híbrida de DNA-proteínas, en la cual ambos bloques de construcción actúan sinérgicamente durante el proceso de auto-ensamble (2). El objetivo de este trabajo es la formación de bionanoestructuras híbridas, donde se utilizarán dos versiones de proteínas quiméricas Cas catalíticamente inactivas fusionadas a dominios de heterodimerización (dCas12a-FRB y dCas12a-FKBP), que formaran un complejo ribonucleoproteico con crRNAs, pudiendo reconocer secuencias específicas de dsDNA, además incorporando la capacidad intrínseca de polimerizarse por el sistema de heterodimerización inducido químicamente en presencia de rapamicina.

Metodología. Se realizó la producción de las proteínas por métodos recombinantes en *Escherichia coli* BL21 D3. Se purificaron secuencialmente por cromatografía de afinidad de Ni-NTA, heparina y por exclusión de tamaño molecular (3). Se realizó la caracterización de la unión al dsDNA por ensayo de movilidad electroforética, caracterización de heterodimerización de proteínas por dispersión de luz dinámica y caracterización de la formación de bionanoestructuras por microscopia de fuerza atómica.

Resultados.

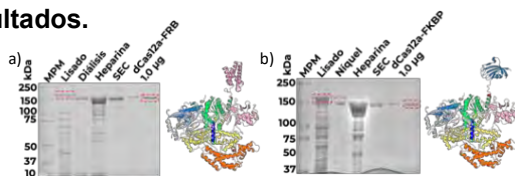


Fig. 1. Geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 7.5 % mostrando la producción y las etapas de purificación de las proteínas a)

dCas12a-FRB y b) dCas12a-FKBP. Se resalta en rojo la proteína purificada.

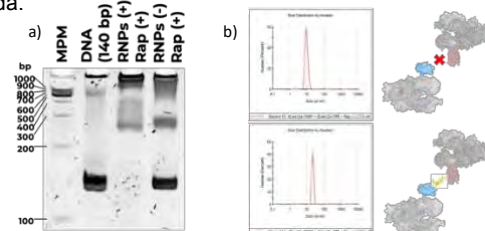


Fig. 2. Unión al dsDNA y dimerización de las proteínas Cas12a. a) Ensayo de movilidad electroforética de los RNPs con fragmentos de DNA en presencia y ausencia de rapamicina en gel de poliacrilamida al 7%. b) Distribuciones de diámetro hidrodinámico de dCas12a-FKBP + dCas12a-FRB (11.7 nm) y c) dCas12a-FKBP + dCas12a-FRB + Rapamicina (24.36 nm).

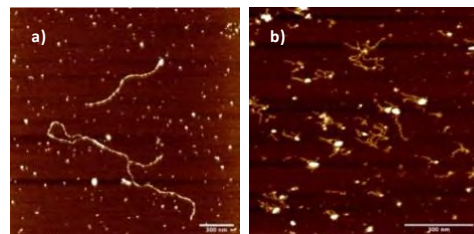


Fig. 2. Microscopia de fuerza atómica de las bionanoestructuras ensambladas. a) y b) Polimerización de los complejos ribonucleoproteicos (dCas12a-FRB/FKBP + crRNAs) ensamblados con fragmentos de dsDNA, en presencia de rapamicina (RNP:DNA:Rapamicina).

Conclusiones. Las proteínas recombinantes dCas12a-FRB y dCas12a-FKBP purificadas (pureza de 84.4% y 86.5%, respectivamente) unieron al DNA de manera específica y se heterodimerizaron en presencia de rapamicina. Las proteínas se auto-ensamblan en bionanoestructuras híbridas tipo nanofibras y nanoramificaciones con longitudes de entre 800 nm y 10 μ m.

Agradecimiento. Este proyecto ha sido financiado con el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IN210121. Beca de CONAHCYT con número de apoyo: 1229033.

Bibliografía.

- Li, F., Li, J., Dong, B., Wang, F., Fan, C., & Zuo, X. (2021). *Chemical Society Reviews*. 50(9): 5650-5667.
- Hernandez-Garcia, A. (2021). *Nanomaterials*. 11(5): 1332.
- Mohanraju, P., J, Oost., M, Jinek., & D, Swarts. (2018). *BIO-PROTOCOL*, 9.

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR GENÉTICO BASADO EN EL SISTEMA
CRISPR-Cas PARA LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi***

Idalia García, Melissa Morales & Armando Hernández García. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Departamento de Química de Biomacromoléculas, Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología, Ciudad de México, C.P. 04510.
armandohg@iquimica.unam.mx

Palabras clave: CRISPR-Cas, Detección, Trypanosoma cruzi

Introducción. Se estima que hay 6 millones de personas infectadas con la Enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, que pueden desarrollar insuficiencia cardíaca, megacolon y lesiones cutáneas [1]. Debido a su importancia, es necesario desarrollar nuevos métodos de diagnóstico molecular con una mayor sensibilidad, especificidad y se de resultados al paciente en un menor tiempo en comparación con otras técnicas actualmente usadas. La técnica de CRISPR-Cas puede ser usada para ello. CRISPR-Cas reconoce e hidroliza la secuencia diana a través de un complejo ribonucleoproteico (RNP) compuesto por la proteína Cas12 y un RNA guía; posteriormente corta DNA de cadena sencilla de forma inespecífica, el cual se utiliza como sonda que emite fluorescencia al ser cortada[2,3] permitiendo identificar la presencia de una secuencia genética asociada al parásito. El objetivo del trabajo es desarrollar un biosensor genético basado en CRISPR-Cas acoplado a LAMP capaz de identificar secuencias específicas del parásito *Trypanosoma cruzi* para obtener un diagnóstico molecular rápido, sensible y específico.

Metodología. Diseño de primers LAMP en software Primer Explorer y de gRNA software ChopChop para secuencia de DNA satélite y DNA minicírculos del cinetoplasto. Los primers y los gRNAs se sintetizaron comercialmente con IDT. La extracción de DNA genómico de *Trypanosoma cruzi* se hizo con el kit de extracción de ZymoBiomics DNA miniprep kit. La amplificación isotérmica del DNA blanco se llevó a cabo en un termoblock a 65°C por 15 minutos, mientras que la reacción de detección con CRISPR-Cas se llevó a cabo a 37°C durante 20 min. La lectura de fluorescencia se realizó con el equipo Cytation.

Resultados.

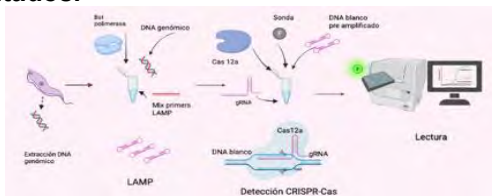


Fig. 1 Esquema del sistema CRISPR-Cas acoplado a LAMP para la detección de *Trypanosoma cruzi*

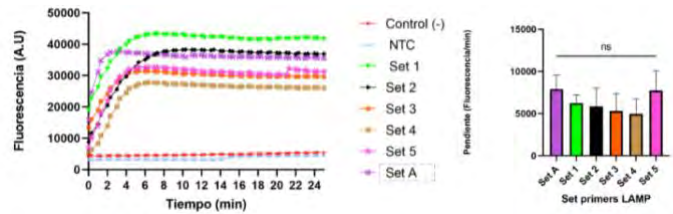


Fig. 2 Detección con sistema CRISPR-Cas de DNA Satélite pre-amplificado por set A de LAMP utilizando gRNAs individuales vs gRNAs múltiples. NTC: No target Control. Control (-): Muestra (-) de LAMP. ANOVA test *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001gRNAs múltiples. NTC: No target Control. Control (-): Muestra (-) de LAMP. ANOVA test *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

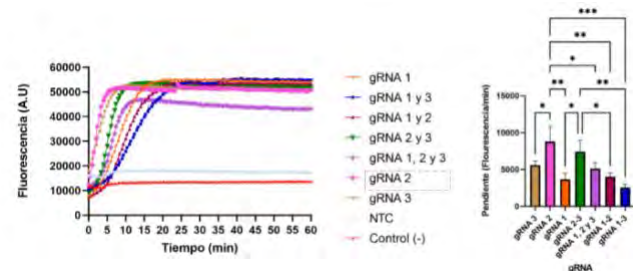


Fig. 3 Detección CRISPR-Cas de DNA Satélite pre-amplificado por los diferentes sets de LAMP. NTC: No target Control. Control (-): Muestra (-) de LAMP. ANOVA test ns: p>0.05

Conclusiones. Se implementó el sistema CRISPR-Cas acoplada a LAMP para la detección molecular de manera eficaz del DNA satélite de *Trypanosoma cruzi*.

Agradecimiento. Proyecto financiado por DGAPA-PAPIIT (IV200820) y por Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID)—Secretaría de Relaciones Exteriores Mexico (Proyectos COVID-19). Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez del Instituto de Investigaciones Biomédicas por la donación de los parásitos. Beca CONACYT con número de apoyo:189038978932.

Bibliografía.

1. OPS-OMS(2014)Enfermedad de chagas. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
2. Hernandez-Garcia, A., Morales-Moreno, M. D., Valdés-Galindo, E. G., Jimenez-Nieto, E. P., & Quezada, A. (2022). *Diagnostics*, 12(6), 1434.
3. Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). *Science*, 360(6387), 436-439.

ENTREGA DIRIGIDA DE RNA TERAPÉUTICO A CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA
MEDIANTE PROTEÍNAS TIPO VIRUS C-S-B

Ximena del Toro Ríos, Armando Hernández García. Instituto de Química, UNAM, Ciudad de México, C.P. 04510, armandohg@iquimica.unam.mx

Palabras clave: Virus-like particles, Gene delivery, Cell uptake

Introducción. Hernandez-Garcia *et al.* se inspiraron en el virus del mosaico del tabaco (TMV) y crearon una familia de proteínas llamadas “C-S-B” o tribloque debido a que están compuestas por tres dominios: un dominio B o bloque de lisinas, que une a través de interacciones electrostáticas con los fosfatos de los ácidos nucleicos, el dominio intermedio es similar a la proteína de la seda, que se autoensambla formando un solenoide de hebras β , y un tercer dominio C que consta de un largo bloque hidrofílico, que protege al ácido nucleico de su entorno (1).

El objetivo de este trabajo es modificar las proteínas “C-S-B” para desarrollar un sistema de entrega dirigido a cáncer de mama y que una de manera eficiente ácidos nucleicos.

Metodología. Mediante técnicas de biología molecular se sustituyó el dominio B de doce lisinas por el dominio NC de la proteína Gag del VIH-1 para hacer la unión más eficiente. La proteína fue expresada en *P. pastoris*, se purificó por precipitación fraccionada y se comprobó su presencia mediante MALDI-TOF, SDS-PAGE y western blot. Se caracterizó la unión distintos tipos de ácidos nucleicos mediante el cambio en la movilidad electroforética (EMSA) y se observó la morfología y el tamaño de las partículas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). Posteriormente, se le fusionará a la proteína, como cuarto dominio de direccionamiento, péptidos dirigidos a receptores sobreexpresados en células de cáncer de mama (EGFR y HER2), y se evaluará su eficiencia de transfección *in vitro*.

Resultados. En la figura 1 se muestra el gel de EMSA en donde se observa que a mayores concentraciones de proteína la migración de los ácidos nucleicos se va retrasando hasta neutralizarse. C-S-B neutraliza el dsDNA a 16.18 μ M, mientras que C-S-NCgag a 0.9 μ M; en el caso del mRNA, C-S-B lo neutraliza a 10.33 μ M, y C-S-NCgag a 5.16 μ M. Por lo que C-S-NCgag une ácidos nucleicos con mayor eficiencia. En la figura 2 se muestran imágenes representativas de AFM de las VLPs formadas con C-S-NCgag y distintos ácidos nucleicos. Se observan estructuras tipo rodillo, como se ha reportado

anteriormente para C-S-B (1), por lo que el dominio NC-gag no interfiere con la formación de VLPs.

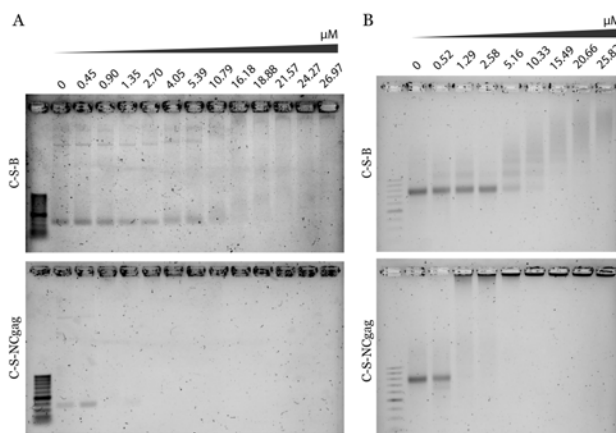


Fig. 1. Formación de VLPs con dsDNA y mRNA. A) EMSA de C-S-B (arriba) y C-S-NCgag (abajo) con dsDNA de 356 pb. B) EMSA de C-S-B (arriba) y C-S-NCgag (abajo) con mRNA de 996 nt. N/P.

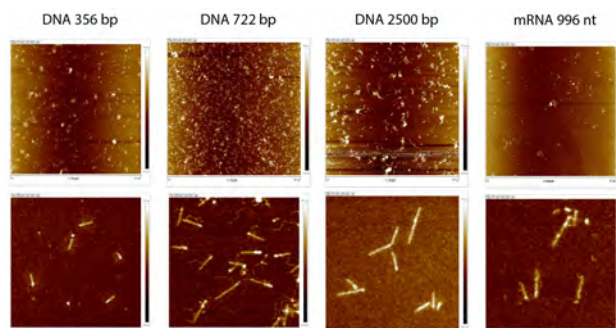


Fig. 2. Caracterización morfológica de VLPs formadas por C-S-NCgag con ácidos nucleicos de distinta longitud. Se muestra la longitud promedio de las partículas.

Conclusiones. La sustitución del bloque B por el dominio NCgag une ácidos nucleicos con mayor eficiencia que C-S-B, y forma VLPs tipo rodillo con dsDNA y mRNA.

Agradecimiento. CONAHCyT Frontera de la Ciencia 2019 (160671).

Bibliografía.

- Hernandez-Garcia, A., Kraft, D. J., Janssen, A. F., Bomans, P. H., Sommerdijk, N. A., Thies-Weesie, D. M., Favretto, M. E., Brock, R., de Wolf, F. A., Werten, M. W., van der Schoot, P., Stuart, M. C., & de Vries, R. (2014). Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses. *Nature nanotechnology*, 9(9), 698–702.

ESTUDIO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS DE HONGOS BASIDIOMICETOS DE IMPORTANCIA EN APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Sofía Tamara Gutiérrez Trejo*, Oscar Arce Cervantes, Silvia Armenta Jaime**. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Instituto de Ciencias Agropecuarias Área académica de ciencias agrícolas y forestales. Tulancingo, Hidalgo 43600. *gu339780@uaeh.edu.mx
**silvia_armenta@uaeh.edu.mx

Palabras clave: Hongos basidiomicetos, Enzimas lignocelulolíticas, CBM

Introducción. La lignocelulosa, componente principal de la mayoría de los residuos generados actualmente, es considerada la materia prima renovable más abundante del planeta (Téllez, et al, 2016).¹ Presenta una alta complejidad dada por sus propiedades recalcitrantes, siendo sus principales componentes; lignina, hemicelulosa y celulosa (Alfaro, 2017)² Los hongos basidiomicetos se han especializado en la degradación de la lignocelulosa. Ellos poseen un complejo enzimático formado por enzimas como: lacasas (Lac), manganeso peroxidasa (MnP), xilanasas (Xil), entre otras (Kumar y Chandra, 2019)³ Los hongos basidiomicetos tienen un amplio potencial para ser utilizados en diferentes aplicaciones biotecnológicas, pero aún se tienen pocos reportes que describen los complejos enzimáticos que producen. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es conocer la diversidad y características estructurales de las enzimas lignocelulolíticas que producen.

Metodología. Se buscó en la base de datos del NCBI los genomas de los hongos basidiomicetos: *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Hericium erinaceus*. Se revisó el porcentaje y calidad del ensamblado. La selección de genomas se basó en el porcentaje de ensamblaje (mayor a 50 por ciento) evaluando la información proporcionada por NCBI. Se revisó el nivel de anotación de los genomas y se buscaron las secuencias de proteínas lignocelulolíticas en bases de datos como Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Para el caso de las proteínas, se identificaron distintas proteínas con actividad lignocelulolítica (Tabla 1), utilizando la función UniProtKB de la base de datos UniProt. Se analizó la estructura primaria de las proteínas e identificaron los elementos determinantes para su función.

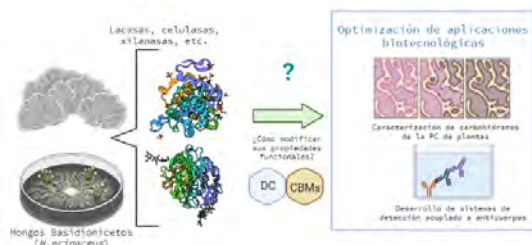





Fig. 1. Metodología de investigación para identificar y modificar las propiedades funcionales de las enzimas lignocelulolíticas

Resultados. Hasta el momento, sólo se cuenta con ocho genomas depositados para *P. ostreatus*, dos para *T. versicolor* y sólo uno de *H. erinaceus*. A pesar de que la literatura sugiere que los hongos basidiomicetos expresan un considerable número de enzimas lignocelulolíticas, únicamente se encontraron cinco enzimas putativas con actividad celulosa y xilanasa para el caso de *H. erinaceus*, por lo que es necesario continuar estudiando esta especie. En el caso de *P. ostreatus* y *T. versicolor* aparentemente presentan un perfil enzimático con un mayor contenido de lacasas, con características estructurales diferentes que podría funcionar como plataformas de evolución para estudios futuros.

Tabla 1. Enzimas lignocelulolíticas presentes en los hongos seleccionados, con secuencia registrada en UniProt.

| Complejo enzimático |  <i>P. ostreatus</i> |  <i>H. erinaceus</i> |  <i>T. versicolor</i> |
|---------------------|---|---|--|
| MnP | 9 | - | - |
| Lac | 73 | - | 39 |
| Xil | 17 | 2 | - |
| Cel | 61 | 3 | - |
| CDH | - | - | 2 |
| GOx | - | - | 1 |

Conclusiones. Los hongos basidiomicetos tienen un amplio potencial para ser utilizados en diferentes aplicaciones biotecnológicas, pero aún se desconocen los complejos enzimáticos que producen. Por lo que este trabajo, permite ampliar el panorama en lo referente a complejos de enzimas lignocelulolíticas, especialmente de *H. erinaceus*.

Bibliografía.

1. Téllez, A. Arana, A, et al. (2016) UPP Capitulo 5, 64-83
2. Alfaro, M. (2017) [Tesis doctoral, upna]. Dialnet
3. Kumar, A y Chandra, R. (2019). Science Direct.
4. Martínez, M y Prieto, A. (2021) (CIB), España, 3-5.

ESTUDIO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS DE HONGOS BASIDIOMICETOS DE IMPORTANCIA EN APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Sofía Tamara Gutiérrez Trejo*, Oscar Arce Cervantes, Silvia Armenta Jaime**. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Instituto de Ciencias Agropecuarias Área académica de ciencias agrícolas y forestales. Tulancingo, Hidalgo 43600. *gu339780@uaeh.edu.mx
**silvia_armenta@uaeh.edu.mx

Palabras clave: Hongos basidiomicetos, Enzimas lignocelulolíticas, CBM

Introducción. La lignocelulosa, componente principal de la mayoría de los residuos generados actualmente, es considerada la materia prima renovable más abundante del planeta (Téllez, et al, 2016).¹ Presenta una alta complejidad dada por sus propiedades recalcitrantes, siendo sus principales componentes; lignina, hemicelulosa y celulosa (Alfaro, 2017)² Los hongos basidiomicetos se han especializado en la degradación de la lignocelulosa. Ellos poseen un complejo enzimático formado por enzimas como: lacasas (Lac), manganeso peroxidases (MnP), xilanasas (Xil), entre otras (Kumar y Chandra, 2019)³ Los hongos basidiomicetos tienen un amplio potencial para ser utilizados en diferentes aplicaciones biotecnológicas, pero aún se tienen pocos reportes que describen los complejos enzimáticos que producen. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es conocer la diversidad y características estructurales de las enzimas lignocelulolíticas que producen.

Metodología. Se buscó en la base de datos del NCBI los genomas de los hongos basidiomicetos: *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Hericium erinaceus*. Se revisó el porcentaje y calidad del ensamblado. La selección de genomas se basó en el porcentaje de ensamblaje (mayor a 50 por ciento) evaluando la información proporcionada por NCBI. Se revisó el nivel de anotación de los genomas y se buscaron las secuencias de proteínas lignocelulolíticas en bases de datos como Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Para el caso de las proteínas, se identificaron distintas proteínas con actividad lignocelulolítica (Tabla 1), utilizando la función UniProtKB de la base de datos UniProt. Se analizó la estructura primaria de las proteínas e identificaron los elementos determinantes para su función.

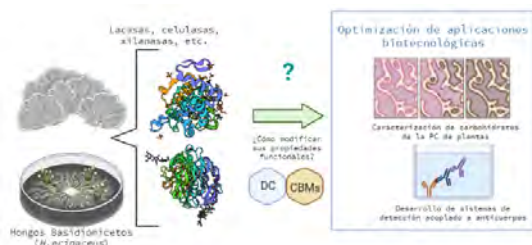





Fig. 1. Metodología de investigación para identificar y modificar las propiedades funcionales de las enzimas lignocelulolíticas

Resultados. Hasta el momento, sólo se cuenta con ocho genomas depositados para *P. ostreatus*, dos para *T. versicolor* y sólo uno de *H. erinaceus*. A pesar de que la literatura sugiere que los hongos basidiomicetos expresan un considerable número de enzimas lignocelulolíticas, únicamente se encontraron cinco enzimas putativas con actividad celulosa y xilanasas para el caso de *H. erinaceus*, por lo que es necesario continuar estudiando esta especie. En el caso de *P. ostreatus* y *T. versicolor* aparentemente presentan un perfil enzimático con un mayor contenido de lacasas, con características estructurales diferentes que podría funcionar como plataformas de evolución para estudios futuros.

Tabla 1. Enzimas lignocelulolíticas presentes en los hongos seleccionados, con secuencia registrada en UniProt.

| Complejo enzimático |  <i>P. ostreatus</i> |  <i>H. erinaceus</i> |  <i>T. versicolor</i> |
|---------------------|--|--|---|
| MnP | 9 | - | - |
| Lac | 73 | - | 39 |
| Xil | 17 | 2 | - |
| Cel | 61 | 3 | - |
| CDH | - | - | 2 |
| GOx | - | - | 1 |

Conclusiones. Los hongos basidiomicetos tienen un amplio potencial para ser utilizados en diferentes aplicaciones biotecnológicas, pero aún se desconocen los complejos enzimáticos que producen. Por lo que este trabajo, permite ampliar el panorama en lo referente a complejos de enzimas lignocelulolíticas, especialmente de *H. erinaceus*.

Bibliografía.

1. Téllez, A. Arana, A, et al. (2016) UPP Capitulo 5, 64-83
2. Alfaro, M. (2017) [Tesis doctoral, upna]. Dialnet
3. Kumar, A y Chandra, R. (2019). Science Direct.
4. Martínez, M y Prieto, A. (2021) (CIB), España, 3-5.

EXPLORING THE DYNAMIC Cu^{2+} -COORDINATION TO PROTEINS AND HORMONES WITH A NH_2 -HXXX MOTIF: THE CASE OF THE PRION PROTEIN, NEUROKININ A AND GLUCAGON.

Carolina Sánchez-López¹, Yanahi Posadas^{1,2}, José Segovia,² Liliana Quintanar^{1,3}

¹Centro de Investigación sobre el Envejecimiento, Cinvestav, Ciudad de México, 14330

²Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Cinvestav, Ciudad de México, 07360

³Departamento de Química, Cinvestav, Ciudad de México, 14330

mcsanchez@cinvestav.mx, lilianaq@cinvestav.mx

Keywords: prion protein, glucagon, copper ion

Introduction. The proteolytic processing of several proteins and peptides—such as the prion protein (PrP), neurokinin A (NKA), and glucagon—yields a common Cu^{2+} -binding motif (NH_2 -HXXX) at the N-terminal. Previously, we demonstrated that the PrP fragment 111–115 (NH_2 -HMAGA) displays two coordination modes depending on the Cu^{2+} /PrP ratio: Mode I, a dimer with a histamine-like¹ coordination; and Mode II that may involve a deprotonated amide.² Interestingly, dimerization is a common process involved in cellular adhesion and signalling.³

In this study, we evaluated whether this dynamic Cu^{2+} -binding is shared by other peptides, such as: NKA, and glucagon.

Methodology. The peptides were synthesized by solid-phase synthesis and Fmoc strategy and purified by HPLC using a semi-preparative C18 reversed phase column and analyzed by mass spectrometry. Peptide solutions were prepared in buffer. Copper coordination was evaluated using circular dichroism (CD) and electronic paramagnetic resonance (EPR).

Results. *Cu(II) coordination to the NKA: a neuropeptide that modulates excitatory neurotransmission.* The formation of the Cu(II) -NKA complex is highly dependent on copper concentration, forming Mode I, II, and even III. Mode I, as Mode II, belongs to the same species for Cu(II) -PrP at low and high copper concentration, respectively. However, CD and EPR show a Mode III at high equivalents, where probably another type of ligands is participating (Figure 1).

Cu(II) coordination to the Glucagon: a hormone involved in glucose regulation. Cu(II) coordination to the Glucagon is highly dependent on copper concentration. Mode I displays *d-d* and LMCT bands that suggest the formation of a histamine-like complex, where imidazole and NH_2 terminal group are involved; while Mode II displays *d-d* and LMCT transitions that suggest participation of a

deprotonated backbone amide in the coordination sphere. The spectroscopic features of Mode I are identical to those observed for Cu(II) -PrP. Although Mode II displays a different CD signal, EPR spectrum is similar to those observed for Cu(II) -PrP ($g_{II} = 2.26$). Additionally, a new set of low intensity signals appears: Mode III (Figure 2).

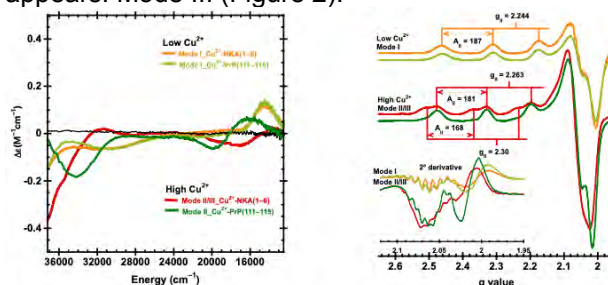


Fig. 1. Comparison of CD and EPR spectra: Cu(II) -PrP vs Cu(II) -NKA

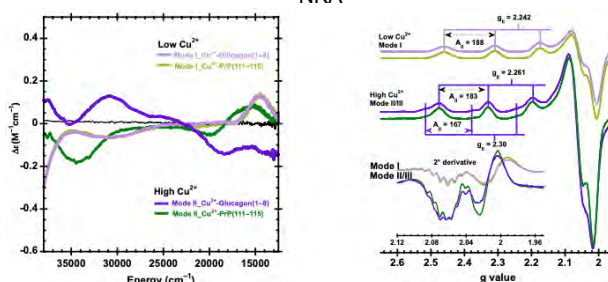


Fig. 2. Comparison of CD and EPR spectra: Cu(II) -PrP vs Cu(II) -Glucagon.

Conclusions.

- Cu(II) binding to the NH_2 -HXXX motif is highly dependent on copper concentration.
- At low Cu(II) concentrations, histamine-like coordination is the only species present in peptides with NH_2 -HXXXX motif.
- At high copper concentrations, there is an equilibrium between two species: a Mode II ($g_{II} = 2.26$) and a Mode III ($g_{II} = 2.30$).
- The coordination Mode II will depend on the residues that follow the Histidine towards the C-terminus (steric effects might play a role defining the nature of the CD spectra).

- This study provides insights into the dynamic of copper coordination of the NH₂-HXXX motif in peptides with this sequence.

Acknowledgements. This research has been supported by a SEP-Conacyt grant and Funding Agency National Council for humanity, Science and Technology (CONAHCYT) through postdoctoral fellowship to YP.

References.

- 1) Sovago, I., et al, (2012) *Cood Chem Rev*, (256), 2225.
- 2) Sánchez-López, C., et al, (2018) *Dalton Trans*, (47), 9274.
- 3) Klemm, JD, et al, (1998), *Annu. Rev. Immunol*, (16), 569.

ASPECTOS ESTRUCTURALES Y MECANÍSTICOS DE LA ENZIMA DAPE DE LAS BACTERIAS ESKAPEE

Manuel Terrazas-López¹, Lilian González-Segura², Jessica Guadalupe Pérez-Payán¹, Naún Lobo-Galo¹, Alejandro Martínez-Martínez¹ y Ángel Gabriel Díaz-Sánchez^{1*}. ¹ Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Cd. Juárez; 32310, ² Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Ciudad de México, 04510. *angel.diaz@uacj.mx

Palabras clave: Bacterias ESKAPEE, fármacos re-propósito, DapE

Introducción.

La multirresistencia bacteriana a antibióticos farmacéuticos es un problema emergente serio. Particularmente, las bacterias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, y *Escherichia coli*, denominadas ESKAPEE, son una alarma preocupante¹. Una estrategia para la solución del problema es la identificación de blancos farmacológicos no explotados para el control bacteriano. Aunque, DapE es un reconocido blanco a este respecto², el descubrimiento y desarrollo de quimioterapias anti-DapE requiere de un estudio profundo de las propiedades fisicoquímicas de la enzima y de los inhibidores. DapE es una N-succinilasa, dimérica estricta, dependiente de dos centros metálicos de zinc (CM1 y CM2), que cataliza la amido-hidrólisis del N-succinil-L,L-2,6-diaminopimelato en succinato y L,L-diaminopimelato². Esta reacción proporciona la única fuente de meso-diaminopimelato y L-Lisina, que son componentes esenciales para la formación del peptidoglicano. Los detalles cristalográficos y bioquímicos de las DapE sugieren que la reacción es facilitada por un ajuste inducido que ocurre después de la unión del sustrato, produciendo el ensamblaje del agujero del oxianión^{2,3}. Los centros metálicos y la base general permanecen inmóviles durante el ciclo, a diferencia de cuatro residuos localizados en dos asas del dominio de oligomerización de la subunidad adyacente del dímero y que se sugiere participan en la unión del sustrato. Dentro de éstos se encuentra la H192, que constituye de manera comprobada la mitad del agujero del oxianión² y aunque se ha propuesto que el CM2 es la otra mitad, la remoción del ion metálico por diálisis exhaustiva produce una metalo-isoforma que conserva el 50 % de su actividad, lo cual no es consistente con el papel sugerido². Identificamos que la H352 se encuentra en una posición adecuada para estabilizar el oxianión del estado de transición, pero esta hipótesis requiere de validación³.

Metodología. Con el propósito de extender el conocimiento estructural y mecanístico de esta clase de

enzimas, obtuvimos detalles estructurales a nivel atómico procedentes de la difracción de diversos cristales en distintas condiciones de la DapE de *E. faecium* (EfDapE) y *E. coli*. Posteriormente, realizamos un estudio estructural y funcional comparativo con las enzimas de las bacterias ESKAPEE^{3,4,5}.

Resultados. La comparación estructural de todas las DapE disponibles en el PDB y las nuestras, revelaron la relativa heterogeneidad conformacional y dinámica molecular que presenta este tipo de enzimas. El análisis de los factores B de los cristales, mostraron las regiones de la enzima susceptibles a mayor movimiento conformacional. Estas regiones incluyen dos bucles denominados asa η_1 y asa η_2 ; un flip del enlace peptídico localizado en una hebra β del dominio de oligomerización y el asa de unión de la parte del DAP del sustrato; las cuales tienen un papel en la interacción proteína-proteína, en la formación del agujero del oxianión, en la interacción con el diaminopimelato y en la especificidad por el sustrato, respectivamente. Observamos cambios en los parámetros catalíticos y preferencia por los inhibidores en las diversas metalo-isoformas con Zn-Zn, Zn-Mn y Zn-Co.

Conclusiones. La mutagénesis sugiere que la H352 es parte del agujero del oxianión. Los grupos funcionales que actúan de manera más eficiente en la inhibición son bases de Lewis, especialmente grupos con azufre y alcoholes.

Agradecimiento. Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar este proyecto.

Bibliografía.

1. Ruekit, S., et al. (2022). *BMC Infectious Diseases*, 22: 1-12.
2. Nocek, B., Reidl, C., Starus, A., Heath, T., Bienvenue, D., Osipiuk, J., Jedrzejczak, R., Joachimiak, A., Becker, D. P., Holz, R. C. (2018). *Biochemistry*, 57: 574-584.
3. Díaz-Sánchez, Á. G. et al. (2019). *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* 22: 1-16.
4. Terrazas-López, M.; Lobo-Galo, N.; Aguirre-Reyes, L. G.; Cuen-Andrade, J. L.; de la Rosa, L. A.; Alvarez-Parrilla, E.; Martínez-Martínez, A.; Díaz-Sánchez, Á. G. (2020). *Biochimie*. 177: 198-212.
5. Lobo-Galo, N.; Terrazas-López, M.; Díaz-Sánchez, Á.; Martínez-Martínez, A. (2021). *J. Biomol. Struct. Dyn.* 39(9): 3419-3427.

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN GENÉTICA DEL VIRUS DEL DENGUE USANDO EL SISTEMA CRISPR-Cas

Marco Antonio Piñón Chávez^{1*}, Armando Hernández García¹⁺

¹Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología. Instituto de Química, UNAM. Ciudad de México, CDMX. C. P. 04510.

Correo electrónico: *marcoantoniopinonchavez@gmail.com; *armandohg@iquimica.unam.mx

Palabras clave: DENV, amplificación isotérmica, CRISPR-Cas

Introducción. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el Dengue es una enfermedad endémica en más de 100 países tropicales y subtropicales, por lo que más de 3.9 mil millones de personas se encuentran en riesgo de contraer esta infección [1]. Causada por un virus de 4 variantes (DENV1-4), se caracteriza por un episodio febril bifásico que, en casos graves, puede evolucionar a fiebre hemorrágica por Dengue (DHF) e, inclusive, en síndrome de shock por Dengue (DSS) [2]. Debido a ello, su diagnóstico oportuno juega un papel importante para el óptimo tratamiento de los pacientes, además de proporcionar información estadística de su distribución, por lo que es necesario desarrollar biosensores altamente específicos, sensibles y, principalmente, accesibles. Así, el sistema CRISPR-Cas ha sido propuesto como un modelo idóneo para el diagnóstico genético que, acoplándose a un sistema de amplificación isotérmica [3], cumple con dichas características.

El presente trabajo, propone el desarrollo de un método de detección del virus del Dengue, mediante el sistema CRISPR-Cas acoplado a amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).

Metodología. La región 3'UTR del virus del Dengue será detectada en un método de 2 pasos: 1) amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), que nos permitirá obtener múltiples copias de la región; b) detección por medio de la ribonucleoproteína AsCas12a, que reconoce una secuencia de 20 nt y posee actividad de corte de ADN en 2 fases: *cis* y *trans*.

Resultados. Se determinó que la región 3'UTR del DENV presenta una mayor cantidad de sitios conservados dentro del genoma de cada variante del virus, por lo que se diseñaron los primers de LAMP que nos permitirán su amplificación simultánea. Hasta el momento, se han evaluado para las variantes de DENV3 y DENV4, obteniendo un resultado positivo. Asimismo, se diseñaron gRNAs que nos permitan su detección por medio de CRISPR-Cas, que serán evaluados en una etapa posterior.

Fig. 1. Gel de agarosa al 1% con los productos de amplificación isotérmica mediante LAMP (20 min, 65°C), usando la región 3'UTR. 1 y 8: Marcador de peso molecular; 2: H₂O; 3: Control negativo; 4 y

5: DENV3 14.7 pM; 6 y 7: DENV4 9.6 pM (estos últimos, por duplicado).

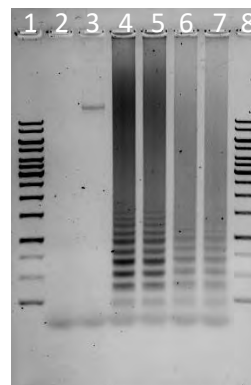


Tabla 1. Algunos de los gRNAs diseñados para la detección simultánea y diferencial de las diversas variantes del DENV, mediante el sistema CRISPR-Cas.

| Variante DENV | Sitio PAM | Secuencia gRNA 5' → 3' | %GC |
|---------------|-----------|------------------------|-----|
| 1 | TTG | TTGTGTGCGGGGGTCTCC | 65 |
| 2 | TTG | TTTCGGGGGGTCTCCTCTA | 60 |
| 3 | TTA | TTTGGGGGGTCTCCTCTA | 60 |
| 4 | TTG | TGTTGGGGGGTCTCCTCTA | 60 |

Conclusiones. El diseño de primers de LAMP nos permite la amplificación simultánea de las variantes del DENV3 y 4. Se evaluarán los gRNAs propuestos para la detección de las variantes del DENV.

Agradecimientos. Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID) — Secretaría de Relaciones Exteriores, Mexico (grant Proyectos COVID-19). Dirección General de Asuntos del Personal Académico — UNAM (grant PAPIIT IV200820). CONAHcyT, por la beca para estudios de posgrado. Dr. Homero Gómez Velasco, por su apoyo para el análisis bioinformático. Melissa Morales e Idalia García, por el apoyo experimental. Bernardo Chombo, por su apoyo experimental y en bioinformática.

Bibliografía.

- World Health Organization (2023) Dengue and severe dengue. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (Consultado el día 25/06/2023).
- Bhatt, P.; Sabeena, S. P.; Varma, M.; Arunkumar, G. (2021) *Curr. Microbiol.* 78 (1), 17–32.
- Hernandez-Garcia, A.; Morales-Moreno, M. D.; Valdés-Galindo, E. G.; Quezada, A.; Jimenez-Nieto, E. P. (2022) *Diagnostics*, 12 (6).

DISSECTING THE EFFECT OF AMYLOID BETA ON CU(II)-COORDINATION TO THE PRION PROTEIN: RE-THINKING NEUROTOXIC MECHANISMS

Yanahi Posadas^{1,2}, Lili Parra Ojeda,² Claudia Pérez Cruz,¹ Liliana Quintanar^{2,3}

¹Department of Pharmacology, Cinvestav, México, 07369,

²Department of Chemistry, Cinvestav, México, 07369,

³Center for Research in Aging, Cinvestav, México, 14330.

e-mail: yosadas@cinvestav.mx

Keywords: Alzheimer, Cellular Prion Protein, Copper

Introduction. The amyloid beta (A β) is a Cu(II)-binding peptide that plays a key role in the pathology of Alzheimer's disease (AD). A previous report demonstrated that A β disrupts the neuroprotective interaction between Cu, cellular prion protein (PrP^C), and N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), inducing NMDAR overactivation and neurotoxicity.^[1] Although it has been proposed that A β competes for Cu with PrP^C, there is no spectroscopic evidence to support this hypothesis. Prion protein (PrP) can bind up to six Cu(II) ions: from one to four at the octarepeat (OR) region, displaying low- and high-occupancy modes, and two at the His96 and His111 sites. Additionally, PrP^C is cleaved by α -secretases at Lys110/His111, yielding a new Cu(II)-binding site at the α -cleaved His111.^[2] In this study, we evaluated the competition for Cu(II) between A β (1-16) and peptide models for each Cu-binding present in the full-length and the α -cleaved PrP.

Methodology. Peptides that model copper-binding sites of prion protein and amyloid beta were prepared using solid-phase synthesis and were purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS).^[3]

The competition for copper between A β (1-16) and Cu(II)-binding sites of prion protein was evaluated using circular dichroism (CD) and electronic paramagnetic resonance (EPR).^[3]

Results.

- *In the full-length Prion Protein:* The impact of A β (1-16) on Cu(II) coordination to PrP is highly site-specific: A β (1-16) cannot effectively compete with the low-occupancy mode at the OR region, while it partially removes the metal ion from the high-occupancy modes and forms a ternary OR-Cu(II)-A β (1-16) complex. In contrast, A β (1-16) removes all Cu(II) ions from the His96 and His111 sites without formation of ternary species.^[3]

- *In the α -cleaved His111 site:* A β (1-16) yields at least two different ternary complexes depending on the ratio of PrP/Cu(II)/A β : the mode I-like and the transient ternary complex.^[3]

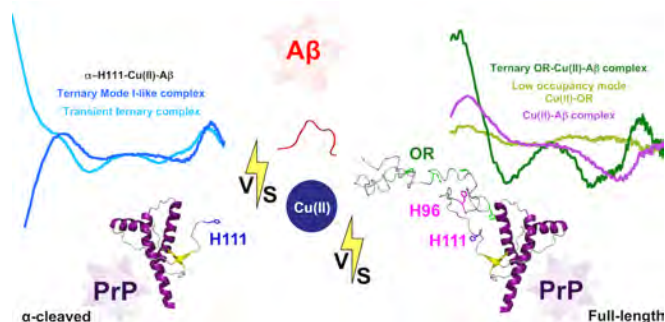


Figure 1. Competition for Cu(II) between A β (1-16) and the prion protein.

Conclusions. Our spectroscopic results indicate that only the low-occupancy mode at the OR region resists the effect of A β , while Cu(II) coordination to the high-occupancy modes and all other tested sites of PrP is perturbed, by either removal of the metal ion or formation of ternary complexes.^[3]

These results provide important insights into the intricate effect of A β on Cu(II) binding to PrP and the potential neurotoxic mechanisms through which A β might affect Cu-dependent functions of PrP^C, such as NMDAR modulation.^[3]

Acknowledgements. Funding Agency National Council for Humanity, Science and Technology (CONAHCYT) through Grant 221134, an undergraduate fellowship to Lili Parra-Ojeda (24473), and a graduate fellowship to Yanahi Posadas (308512).

References.

1. You, H., et al., (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(5): p. 1737-42.
2. Posadas, Y., et al., (2022) *Curr Opin Chem Biol*. 66: p. 102098.
3. Posadas, Y., et al., (2021) *Inorg Chem*, 2021. 60(12): p. 8958-8972.

DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS PROTEICAS CONJUGADAS CON VANCOMICINA

Odiseo Hernández Cortés, Armando Hernández García. Instituto de Química, UNAM, Ciudad de México, C.P. 04510, armandohg@iquimica.unam.mx

Palabras clave: Vancomicina, Virus-like Particles, Drug delivery

Introducción. A raíz del incremento en la resistencia a los antimicrobianos surge la necesidad de encontrar alternativas al tratamiento y administración de antibióticos. Hernandez-Garcia et al. (1) desarrollaron una familia de proteínas llamadas CSB. Inspiradas en la proteína de la cápside del virus del mosaico del tabaco (TMV), estas proteínas se caracterizan por tener tres dominios: el dominio C que proporciona estabilidad coloidal, el bloque B que al estar conformado por lisinas une electrostáticamente a DNA y finalmente el bloque S que es similar a la proteína de la seda y proporciona capacidad de auto-ensamble. Este trabajo busca obtener y caracterizar nanopartículas de la proteína C-S-B conjugada químicamente con vancomicina y evaluar su actividad.

Metodología. La proteína se expresa recombinantemente en la levadura *P. pastoris*, se purifica mediante precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y acetona. La presencia de la proteína se comprueba con SDS-PAGE. Una vez purificada la proteína se usa el agente entrecruzante Sulfo-SMCC para poder realizar el conjugado entre la proteína CSB-vancomicina. Posteriormente mediante espectroscopía UV e infrarroja se comprueba la formación del conjugado. Posteriormente, se evaluará la actividad antimicrobiana del conjugado con ensayos de microdilución en placa y se observarán las nanopartículas usando microscopía de fuerza atómica.

Resultados. La producción y purificación de la proteína recombinante CSB ya se ha realizado. La formación del conjugado se encuentra en proceso, además, la metodología correspondiente para la validar la formación del conjugado ya ha sido probada y promete ser lo suficientemente sensible para detectar al antibiótico una vez formado el conjugado.

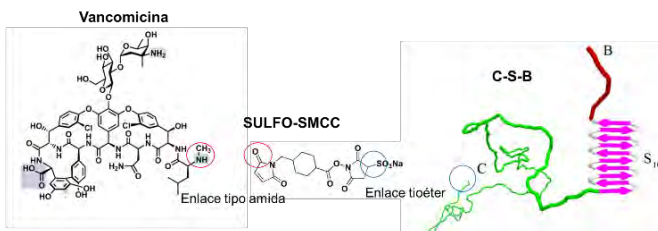


Fig. 1. Esquema general del conjugado CSB-vancomicina, utilizando Sulfo-SMCC como agente entrecruzante.

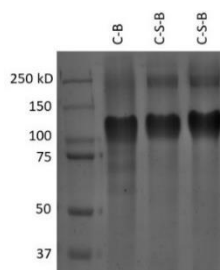


Fig. 2a. SDS-page (acrilamida 7.5%) realizado después de la purificación de la proteína CSB.

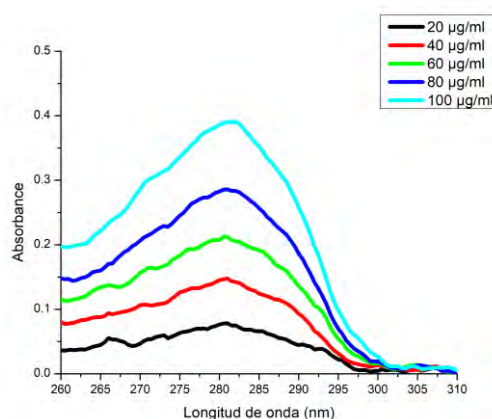


Fig. 2b. Curva de absorbancia (UV-visible) de vancomicina en buffer de fosfatos pH 6.8.

Conclusiones. La proteína C-S-B se ha producido y purificado exitosamente. Por otra parte, el método espectrométrico de detección de vancomicina ha demostrado ser lo suficientemente sensible para detectar al antibiótico aún en concentraciones bajas. Se espera que la actividad antimicrobiana del conjugado CSB-vancomicina sea superior en comparación al antibiótico por sí solo.

Agradecimiento. CONAHcyT Frontera de la Ciencia 2019 (160671).

Bibliografía.

- Hernandez-Garcia, A., Kraft, D. J., Janssen, A. F., Bomans, P. H., Sommerdijk, N. A., Thies-Weesie, D. M., Favretto, M. E., Brock, R., de Wolf, F. A., Werten, M. W., van der Schoot, P., Stuart, M. C., & de Vries, R. (2014). Nature nanotechnology, 9(9), 698–702.

EVALUACIÓN DE DERIVADOS FLUOROQUINOLAS CON TETRAZOLES COMO INHIBIDORES DE NSP5, NSP12 Y SPIKE EN SARS-CoV-2

Manuel Mauricio Jasso Ortiz, Jaime Cardoso Ortiz, Ma. del Refugio Cuevas Flores. Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad de Ciencias Químicas, Zacatecas, Zac 98160, 28mmj0@gmail.com.

Palabras clave: SARS-CoV-2, Fluoroquinolonas, Docking molecular

Introducción. Las fluoroquinolonas son compuestos con una estructura base de anillos heterocíclicos benzoides a los que puede agregarse modificaciones estructurales que le proporcionen los rasgos deseados⁽¹⁾. En este sentido se propusieron 19 derivados de fluoroquinolonas considerando sus modificaciones estructurales en series a y b, para los cuales se indagó en su actividad biológica frente a diversas moléculas del SARS CoV-2. Mediante dinámica molecular⁽²⁾ se ha descrito el cambio conformacional mediado por aminoácidos del dominio RBD en la subunidad S que juegan un rol clave en la intercalación de la proteína Spike del SARS-CoV-2 en la ACE-2. De igual manera, tanto las proteínas no estructurales NSP5 (proteasa principal) como la NSP12⁽³⁾ (polimerasa dependiente de ARN) son blancos novedosos al ser proteínas necesarias en el ciclo de contagio del virus⁽⁴⁾

El objetivo de este trabajo es elucidar la capacidad de los derivados de fluoroquinolonas con tetrazoles como potenciales inhibidores en las proteínas mencionadas. Al igual que describir sus propiedades ADME

Metodología: El dibujado de las estructuras tridimensionales se realizó utilizando Avogadro para luego minimización de la energía. Posteriormente sus propiedades farmacocinéticas se evaluaron utilizando el servidor SwissADME para realizar una predicción de su metabolismo vía oral. La evaluación de la pose geométrica y energía libre de unión se llevó utilizando la suite de Auto Dock Vina utilizando una caja centrada en cada sitio de unión. Los blancos de interés fueron descargados del PDB con los códigos 6VXX,6M71 Y 6LU7 (de acuerdo al orden de aparición). Luego se utilizó Pymol para poder visualizar las interacciones apoyados y el servidor de Proteín-Ligand Interaction Profile (PLIP).

Resultados. La valoración cuantitativa de las propiedades farmacocinéticas de 5 de los 19 derivados se reporta en la tabla 1; de los cuales a2, b2 y b9 quedan completamente dentro del lineamiento mencionado en SwissADME. Se empleo la Licorina y el Nirmaltrevir como referencia al momento de evaluar el acoplamiento con la polimerasa y el Mpro respectivamente. En la tabla 2 se muestran los resultados de los acoplamientos moleculares de los 5

mejores ligandos. En la figura 1 se observa un acoplamiento entre b9 y el RBD, se aprecian 10 interacciones de hidrogeno entre las cadenas A y C

| Metadatos | Tamaño (g/mol) | Inestabilidad (Fracción Csp3) | Flexibilidad (Fr. enlaces rotables) | Apoptosis (LogP) | AD Log S | Polaridad (A ²) |
|-----------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------------|------------------|---------------|-----------------------------|
| Rango aceptable | 150 < T < 500 | 0.25 < Inest < 1 | 0 < Flex < 9 | 7 < L < 5 | -6 < Inso < 0 | 20 < Pol < 130 |
| a2 | 462.65 | 0.73 | 6 | 3.95 | -5.87 | 105.63 |
| a9 | 502.71 | 0.76 | 5 | 4.92 | -6.87 | 105.63 |
| b2 | 450.63 | 0.71 | 6 | 3.8 | -5.71 | 105.63 |
| b6 | 530.74 | 0.73 | 7 | 2.96 | -5.73 | 148.15 |
| b9 | 490.69 | 0.75 | 5 | 4.76 | -5.56 | 102.8 |

Tabla 1. Propiedades ADME de 5 de los mejores derivados.

| | Acoplamiento | | | | Acoplamiento | | | | |
|----------|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|------------|
| | Menor ΔG (kcal/mol) | Eficiencia del Ligando | Menor ΔG (kcal/mol) | Eficiencia del Ligando | Menor ΔG (kcal/mol) | Eficiencia del Ligando | Menor ΔG (kcal/mol) | Eficiencia del Ligando | |
| Estándar | -7.3 | -0.847619048 | -6.8 | 0.3236095 | a2 | -8.7 | -0.273875 | -7.6 | -0.2329 |
| a2 | -8.3 | -0.259375 | -7.1 | -0.223879 | a9 | -9.8 | -0.268971 | -8.2 | -0.234882 |
| a9 | -9.7 | -0.277148827 | -7.6 | -0.2171429 | b2 | -8.7 | -0.2806452 | -7.6 | -0.2451613 |
| b2 | -8.6 | -0.277419355 | -7.3 | -0.2354839 | b6 | -9.7 | -0.2771429 | -8 | -0.2285716 |
| b6 | -8.3 | -0.277148827 | -7 | -0.2 | b9 | -10.1 | -0.2970988 | -8.5 | -0.22 |
| b9 | -9.8 | -0.288235294 | -7.9 | -0.2323529 | | | | | |

Tabla 2. Acoplamiento molecular de los 5 mejores derivados.

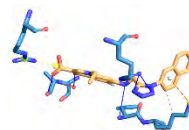


Imagen 1.- Acoplamiento de b9 con RBD.

Conclusiones. Los derivados de fluoroquinolonas con tetrazoles parecen presentar energías libres que favorecen la interacción entre blanco y ligando, siendo esta mayor que la obtenida de los fármacos de referencia, es necesario realizar mayores estudios que corroboren la unión de cada ligando a los blancos de interés. De igual manera la mayoría de propiedades ADME entran dentro de lo especificado para su administración vía oral, por lo que en caso de emplearse puede ser considerada como vía de administración.

Agradecimiento. Se agradece a la Universidad Autónoma de Zacatecas, al laboratorio de Química Cuántica. Laboratorio de Toxicología y farmacia.

Bibliografía.

- Cardoso-Ortiz, J et al.. (2023). *Journal of Molecular Structure*, 1274, 134507. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134507>
- Sztain, T et al. (2021). *Nature Chemistry*, 13(10), 963-968. <https://doi.org/10.1038/s41557-021-00758-3>
- Askari, F. S et al. (2022). *Future Virology*, 17(10), 743-759. <https://doi.org/10.2217/fvl-2022-0054>
- Flint, S. J., Racaniello, V. R., Rall, G. F., Skalka, A. M., & Enquist, L. W. (2015). "Synthesis of RNA from RNA Templates" *Principles of virology* (4th edition). ASM Press. Pag: 157-179; 225-239

MECANISMOS DE PLEGAMIENTO DE LA PROTEÍNA ANUDADA LEPTINA.

Marisol López Hidalgo, Albertana Jiménez Pineda, Gabriel Iván Ortega López, Samantha Ysaïs Chong, Brandon Jorge Romero Rodríguez, Claudia G. Benítez Cardoza. Laboratorio de Investigación Bioquímica, SEPI-ENMH Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México. CP 07320, México. cbenitezc@ipn.mx

Palabras clave: Proteínas anudadas, dinámica molecular, dicroísmo circular

Introducción. La leptina es una proteína que modula un gran número de funciones fisiológicas, entre ellas el control del peso corporal, el metabolismo y la regulación del sistema inmunitario [1]. Su estructura presenta cuatro hélices-alfa y un puente disulfuro entre las cisteínas 96 y 146 (extremo C-terminal). La formación del puente disulfuro crea un anillo o lazo, a través del cual se enhebra parte de la cadena polipeptídica, generando así una topología anudada, denominada lazo perforado. Esta inusual topología representa una mayor complejidad para entender el mecanismo de plegamiento de este tipo de proteínas, que además de plegarse, deben anudarse. En este trabajo se presentan resultados de la reacción de plegamiento/desplegamiento de la leptina a través de metodologías *in silico* e *in vitro* para describir dicho mecanismo [2]. También se diseñaron mutantes puntuales para incrementar la estabilidad térmica de la leptina.

Metodología. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular (SDM) utilizando el programa GROMACS, y el campo de fuerzas OPLS-AA [3], a distintas temperaturas (310, 400, 500 y 600 K). Las construcciones de las mutantes de leptina se obtuvieron mediante ensayos de mutagénesis dirigida. La leptina silvestre y sus mutantes (Gol1, Gol4, Gol5, Gol6, MR1, W100E, entre otras) se sobre-expresaron en un sistema heterólogo y se purificaron hasta homogeneidad con diversas técnicas cromatográficas. Se obtuvieron los perfiles de desplegamiento térmico en distintas condiciones experimentales evaluando los cambios de estructura secundaria por espectroscopía de dicroísmo circular a 220 nm [4].

Resultados.

La reacción de desplegamiento térmico de la leptina se puede describir con un mecanismo de dos estados. La reversibilidad para todas las mutantes estudiadas hasta el momento varía del 75 al 98% dependiendo de la posición de la mutante y de la identidad de la cadena lateral en cada caso (Fig. 1). Las SDM revelan que el anillo formado por el puente disulfuro se comprime a temperaturas altas, impidiendo que el extremo N-terminal se desenhebre, a pesar de los cambios en estructura secundaria que implican la pérdida de la estructura helicoidal (Fig. 2).

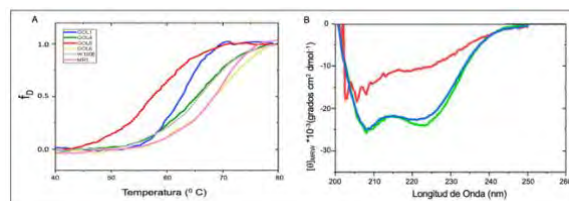


Fig. 1. A) Curvas de desplegamiento térmico de mutantes de leptina evaluando los cambios de estructura secundaria, por la señal de dicroísmo circular a 220 nm. B) Espectro de dicroísmo circular de la leptina GOL6, en verde se muestra la proteína nativa, en rojo a la desplegada térmicamente y en azul a la leptina enfriada después del desplegamiento térmico.

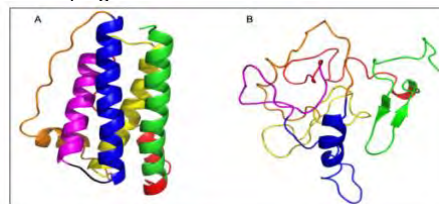


Fig. 2. Representación de listones de la leptina W100E en forma A) Nativa y B) desplegada térmicamente (SDM, GROMACS, 100 ns 600 K). Las elementos de estructura secundaria se muestran en colores: $\alpha 1$ (verde), $-\alpha 2$ (magenta), $\alpha 3$ (azul) y $\alpha 4$ (amarillo).

Conclusiones. La proteína anudada leptina se despliega a través de un mecanismo de dos estados y con alto porcentaje de reversibilidad. El nudo no se deshace por efecto de la temperatura y por el contrario el anillo por el cual se enhebra el extremo N-terminal se comprime, impidiendo que este se salga del lazo.

Agradecimiento. Agradecemos a Medix S.A. de C.V. y a la SIP-IPN el patrocinio para el desarrollo de este proyecto. AJP, GIOL, SYC, y BJRR agradecen beca CONACYT y BEIFI-IPN para el desarrollo de sus tesis de licenciatura y posgrado.

Bibliografía.

1. Abend Bardagi A, Dos Santos Paschoal C, Favero GG, Riccetto L, Alexandrino Dias ML, Guerra Junior G, Degasperi G. (2023). *Immunol Invest.*; 52(1):117-133.
2. Haglund E, Pilko A, Wollman R, Jennings PA, Onuchic JN. (2017). *J Phys Chem B.* 121(4):706-718.
3. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. (2005). *J Comput Chem.* 26(16):1701-18.
4. Mixcoha-Hernández E, Moreno-Vargas LM, Rojo-Domínguez A, Benítez-Cardoza CG. (2007). *Protein J.*; 26(7):491-8.

EVALUACIÓN COMPUTACIONAL DE DERIVADOS DE SISTEMAS HÍBRIDOS DE FLUOROQUINOLONAS CON ACCIÓN FARMACOLÓGICA EN CÁNCER DE PULMÓN

Ana Ximena Medina Moreno, Jaime Cardoso Ortiz, Ma. Del Refugio Cuevas Flores, Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Zacatecas, Zac. C.P.98160, ximen4medin4@gmail.com

Palabras clave: Fluoroquinolonas, Cáncer, Topoisomerasas

Introducción. Las fluoroquinolonas son moléculas sintéticas compuestas por anillos heterocíclicos. Experimentalmente han demostrado tener actividad inhibitoria en diferentes tipos de dianas terapéuticas, en particular en cáncer de pulmón (1). El mecanismo de acción consiste en impedir el resellado de la cadena de ADN (2) que se rompe por acción de las Topoisomerasas. Por lo tanto, se decidió evaluar 19 derivados de híbridos de fluoroquinolonas como potenciales inhibidores de Topoisomerasas involucradas en cáncer de pulmón. Por su diseño estructural, los híbridos de fluoroquinolonas se clasificaron como grupo a y b para este estudio. Las propiedades farmacocinéticas (ADME) son parámetros de importancia para el diseño de moléculas con actividad farmacológica (3), por lo tanto, se evaluaron. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los 19 derivados de híbridos de fluoroquinolonas con tetrazoles, como inhibidores de las Topoisomerasas I y II (4), así como la estimación de las propiedades farmacocinéticas de éstos.

Metodología. Mediante el uso del software Avogadro se diseñaron los 19 derivados de sistemas híbridos, y se optimizaron con mecánica molecular. Las propiedades ADME se estimaron en el servidor SwissADME, así como los microestados de protonación en el programa MarvinSketch. Las coordenadas cartesianas de los receptores se obtuvieron a partir de las estructuras cristalográficas reportadas en la base de datos Protein Data Bank, con los códigos 1EJ9 y 4G0V. La preparación de los sistemas se llevó a cabo en el programa Pymol y en la suite de Auto Dock y Auto Dock Tools, mismos que se utilizaron para el análisis de las interacciones de las distintas poses entre ligando y receptor.

Resultados. En la tabla 1, los datos resaltados en color verde tienen mayor viabilidad para administrarse vía oral, mientras que, en color rojo se muestra que una o dos propiedades farmacocinéticas quedan fuera del rango permitido, por lo tanto, son menos viables. En la tabla 2, se reportan las energías de unión (la mayor y menor) de acoplamiento molecular receptor-ligando, utilizando un grid en itálica (centrado en el sitio

de unión) de 26x22x28 (Topo I) y de 24x22x26 (Topo II), así como la eficiencia del ligando. Se tomó como fármaco de referencia a la Mitoxantrona, que es utilizado como anticancerígeno (1).

Tabla 1. Propiedades farmacocinéticas de los derivados.

| Molécula | Tamaño (g/mol) | Insaturaciones (Fracción Csp ³) | Flexibilidad (Núm de enlaces rotables) | Polaridad (Å ³) | Liposolubilidad (XLOGP ₃) | Insolubilidad (Log S) |
|--------------------|----------------|---|--|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| Valores aceptables | 150 < T < 500 | 0.25 < Insa < 1 | 0 < F < 9 | 20 < P < 130 | >0.7 < L < 5 | >6 < Inso < 0 |
| Mitoxantrona | 444.48 | 0.36 | 12 | 163.18 | 1 | -4.8 |
| a2 | 433.42 | 0.23 | 7 | 117.76 | 3.39 | -4.69 |
| a5 | 447.64 | 0.26 | 6 | 117.76 | 4.18 | -5.38 |
| a9 | 469.45 | 0.16 | 6 | 117.76 | 4.7 | -5.54 |
| b8 | 436.42 | 0.24 | 8 | 130.65 | 2.43 | -4.03 |
| b9 | 457.44 | 0.12 | 6 | 117.76 | 4.32 | -5.67 |

Tabla 2. Energías de unión receptor-ligando.

| | Topoisomerasa I | | | | Topoisomerasa II | | | |
|--------------|-----------------|------------------------|----------|------------------------|------------------|------------------------|----------|------------------------|
| | Mayor ΔG | Eficiencia del ligando | Menor ΔG | Eficiencia del ligando | Mayor ΔG | Eficiencia del ligando | Menor ΔG | Eficiencia del ligando |
| Mitoxantrona | -7 | -0.175 | -8.9 | -0.223 | -6.6 | -0.165 | -8.1 | -0.203 |
| a2 | -10 | -0.313 | -12.8 | -0.4 | -8.8 | -0.275 | -10.2 | -0.319 |
| a5 | -8.1 | -0.245 | -10.5 | -0.318 | -8 | -0.242 | -9.1 | -0.276 |
| a9 | -9.9 | -0.283 | -12.5 | -0.357 | -8.5 | -0.243 | -9.5 | -0.271 |
| b8 | -9.3 | -0.291 | -11.2 | -0.35 | -8.6 | -0.269 | -9.4 | -0.294 |
| b9 | -7.9 | -0.232 | -10.7 | -0.315 | -7.6 | -0.224 | -9 | -0.265 |

Conclusiones. En las tablas se reportan resultados de 5 complejos únicamente y el fármaco de referencia, en donde las propiedades farmacocinéticas de a5 se encuentran dentro del rango permitido. Los cinco derivados resultaron tener mejores interacciones en los receptores que el fármaco de referencia. Se observa una mayor efectividad en la Topo I por parte de éstos.

Agradecimientos. Universidad Autónoma de Zacatecas, Laboratorio de Química Cuántica y Modelado Molecular, Laboratorio de Toxicología y Farmacia.

Bibliografía.

- Abdel-Aal, M. A. A., Abdel-Aziz, S. A., Shaykoon, M. Sh. A., & Abu-Rahma, G. E. A. (2019). *Towards anticancer fluoroquinolones: A review article. Archiv Der Pharmazie*, 352(7), 1800376.
- Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., Pan, X.-S., Sawhney, R., Thompson, A. W., McAuley, K. E., Fisher, L. M., & Sanderson, M. R. (2009). *Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), 667-669.
- Moda, T. L., Torres, L. G., Carrara, A. E., & Andricopulo, A. D. (2008). *PK/DB: Database for pharmacokinetic properties and predictive in silico ADME models. Bioinformatics*, 24(19), 2270-2271.
- Sinha, B. K. (1995). *Topoisomerase Inhibitors: A Review of their Therapeutic Potential in Cancer. Drugs*, 49(1), 11-19.

OPTIMIZACIÓN DE LA DETECCIÓN GENÉTICA DEL SARS-CoV-2 CON EL SISTEMA CRISPR-CAS12a

Jessica Zacarias Flores, Melissa D. Morales Moreno, Armando Hernández García, Instituto de

Química, Ciudad de México, CP. 31514243@quimica.unam.mx, armandohg@quimica.unam.mx

Palabras clave: Optimización, CRISPR-Cas12a, SARS-Cov-2

Introducción. Por su actividad de endonucleasa se ha comenzado a utilizar el sistema CRISPR-Cas12a para la detección de SARS-Cov-2,(1) el cual consta de una proteína Cas12a y un gRNA que hibrida con un ADN objetivo, adicionalmente la actividad colateral trans de la proteína Cas12a se aprovecha para detectar al ADN objetivo mediante fluorescencia (2) por lo que ya es un sistema establecido,(3) sin embargo, su optimización puede incrementar la sensibilidad y eficiencia(4). Es por ello que se tiene como objetivo optimizar parámetros como la temperatura, tipo de buffer y concentración de los componentes (gRNA y Cas12a) con el fin de mejorar la señal junto con la sensibilidad, así como el tiempo y la velocidad de detección del sistema CRISPR-Cas12a para el gen N del SARS-CoV-2.(4,5)

Metodología. Se forma el complejo RNP en buffer NEB 2.1 con 200 nM Cas12a y 200 nM de gRNA incubando a 37°C por 20 minutos, se añade 250 nM de sonda reportera etiquetada con FAM y un *quencher* y 5 nM de ADN blanco y se coloca la reacción en una microplaca para se lee por 1 hora a 37°C en un lector de fluorescencia(3). Para la optimización de la temperatura se leyó la placa a temperaturas desde 30°C con incrementos de 7°C hasta 65°C. Para la optimización de buffer de reacción se probaron diferentes buffers y aditivos. (5)

Resultados

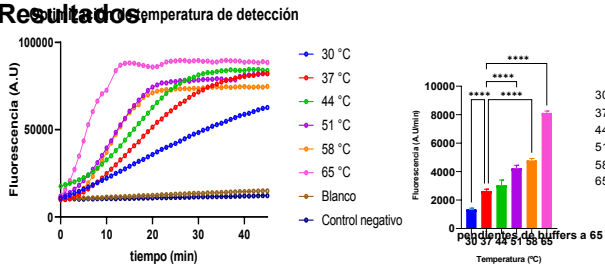


Fig. 1. Optimización de la temperatura de detección.

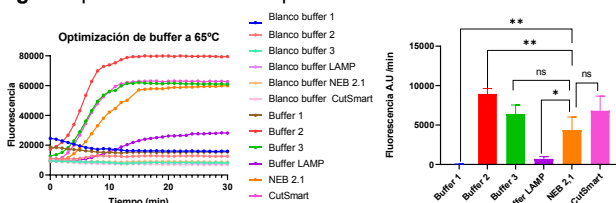


Fig. 2. Optimización de buffer de la reacción de detección.

Buffer 1: (50 mM tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MnSO4, 100 µg/ml DTT)
 Buffer 2: (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 15 mM MgCl2, 1 mM DTT)
 Buffer 3: (40 mM Tris-HCl, 6mM MgCl2, 1 mM DTT, 2 mM espermidina, 40 mM Glicina, 4 % PEG 8000, 0.001% Triton x100)

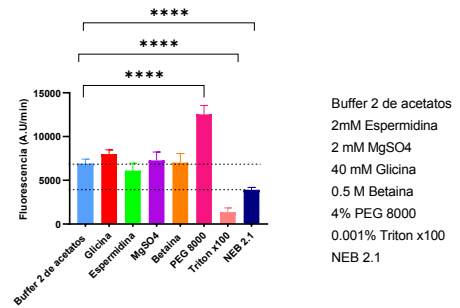


Fig. 3. Buffer 2 de acetatos con diferentes aditivos

En la optimización de la temperatura se observó que ha 65 °C a los 13 minutos aumentó la velocidad de reacción hasta 3 veces (Fig.1) El buffer en el que hubo una mejora en la señal fue el buffer 2 (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 15 mM MgCl2, 1 mM DTT, pH 8.8) en presencia de 4% PEG 8000 (Fig. 2 y 3).

Conclusiones. A 65°C la velocidad de la reacción de detección aumentó 3 veces. El mejor buffer para la detección fue el buffer 2, logrando aumentar casi el doble la velocidad de reacción. Hubo una ligera mejora del sistema de reacción con el buffer 2 de acetatos comparada con el de buffer 2 inicial de clorhidratos. Al añadir 4% PEG 8000 en el buffer 2 de acetatos se mejoró la velocidad 1.8 veces. Hasta ahora se ha logrado reducir el tiempo de detección a menos de 10 minutos y sin pre-amplificación.

Agradecimiento. Proyecto financiado por DGAPA-PAPIIT (IV200820) y por Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID)—Secretaría de Relaciones Exteriores Mexico (Proyectos COVID-19). Beca de licenciatura PAPIIT

Bibliografía.

- Hernandez-Garcia A, Morales-Moreno MD, Valdés-Galindo EG, Quezada A, Jimenez-Nieto EP. *Diagnostics*. 2022;12(6).
- Nouri R, Tang Z, Dong M, Liu T, Kshirsagar A, Guan W. *Biosens Bioelectron*. 2021;178.
- Morales-moreno, Melissa D, Reza MM, Fiordelisio T, Valdés EG. *CRISPR J*. 2023;6(2):1-11
- Hsieh K, Zhao G, Wang T huei. *Royal Society of Chemistry*. 2020;145:4880-4888.
- Qiu M, Ming X, Lei Z. *J Anal Test*. 2022;6(1):44-52.

Descubrimiento de inhibidores para la glutatión transferasa de *Taenia solium* de 25.5 kDa como posibles agentes antiparasitarios

M.C. César Sánchez¹, Dr. Ponciano García¹, M.C. Roberto Flores², Dr. Abraham Landa², Dr. Rafael A. Zubillaga¹.

¹Departamento de Química, UAM-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa, CDMX 09340, México. csj3140@xanum.uam.mx. ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Palabras clave: Docking, Dinámica molecular, Conformaciones.

Introducción. El docking molecular es una herramienta clave en las primeras etapas del diseño de fármacos, con él se criban compuestos de quimiótecas, con potencial para interactuar con dianas farmacológicas y modificar su actividad biológica. Pese a ello su eficacia es baja, solo del 5 al 10% de las moléculas cribada presentan actividad. Una de las razones es la incapacidad de los algoritmos de simular la flexibilidad del receptor. Recientemente el *ensamble docking*, se ha propuesto como una estrategia para superar esta limitante. Consiste en realizar *docking* rígidos, sobre conformaciones de la misma proteína diana, que pueden obtenerse de cristales depositados en el PDB o mediante simulaciones de dinámica molecular (DM). El objetivo de este trabajo fue identificar potenciales inhibidores para la GST de 25.5 kDa tipo mu de *Taenia solium* (Ts25GST), que puedan ser usados para el desarrollo de tratamientos antiparasitarios.

Metodología. Construimos un modelo por homología de la enzima, con *homology model* de MOE y el templado pdb-id:1gsu. Con este modelo realizamos dos DM de 1 μ s, con GSH unido (holo) y sin el (apo). Mediante la paquetería TTclust, agrupamos las trayectorias de la simulación holo en conjuntos en función de su similitud estructural (RMSD) y seleccionamos la más representativa de cada grupo. Identificamos un potencial sitio de unión a ligando mediante simulaciones de solvente mezclado (SILCS). Finalmente se realizó un cribado virtual (*ensamble docking*) con las estructuras obtenidas de los clústeres y el sitio, sobre la quimióteca Diver-Set Express Pick (Chembridge). Los acoplamientos se realizaron con Autodock Vina y GOLD.

Resultados.

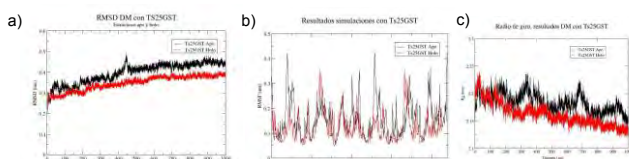


Fig. 1. Comparación del cálculo de (a) RMSD, (b) RMSF y (c) radio de giro de las DM holo y apo. Los resultados sugieren mejor estabilidad para la primera.

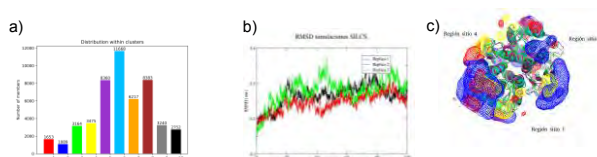


Fig. 2. Resultado del proceso de agrupamiento y SILCS. (a) clústeres construidos y distribución de trayectorias, (b) RMSD de las DM de solvente mezclado para el método SILCS, (c) Fragmaps para la identificación de sitios con SILCS.



Fig. 3. Flujo de trabajo del proceso de cribado virtual. Se realizó en tres etapas: primero con un cribado laxo, cuyos resultados se utilizaron para un segundo cribado más robusto. En la última etapa se realizaron *simulaciones de acoplamiento* sobre GST tipo mu humas, buscando ligandos selectivos.

Conclusiones. Se lograron identificar 29 potenciales inhibidores. Estos se evaluarán mediante pruebas *in vitro* de inhibición sobre una Ts25GST recombinante, a fin de determinar si presentan actividad biológica.

Agradecimiento. Esta investigación fue financiada por el CONAHCYT, proyecto CF19-7397 y la beca de posgrado nacionales con CVU 937683.

Bibliografía.

- Mandal, S., & Mandal, S. K. (2009). *European journal of pharmacology*, 625(1-3), 90-100.
- Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). *Quantitative Biology*, 7, 83-89.
- Amaro, R. E., Baudry, J., Chodera, J., Demir, Ö., McCammon, J. A., Miao, Y., & Smith, J. C. (2018). *Biophysical journal*, 114(10), 2271-2278.
- Prakash, P., Hancock, J. F., & Gorfie, A. A. (2015). *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 83(5), 898-909.
- Tubiana, T., Carvaille, J. C., Boulard, Y., & Bressanelli, S. (2018). *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58(11), 2178-2182.

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN HETERODÍMERO DE LA EPÓXIDO HIDROLASA DE *Pseudomonas aeruginosa*, PARA SU USO COMO HERRAMIENTA EN LA EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CAPACIDAD CALORÍFICA SOBRE LA CATÁLISIS ENZIMÁTICA.

Parra Espinoza, José Alberto¹., Jalomo, Ekaterina¹., Bahl Christopher²., Saab-Rincón Gloria¹

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Mor. 62210. ² AI Proteins, Inc, 20 Overland St. Boston MA 02215. josé.alparra.es@gmail.com

Palabras clave: capacidad calorífica, catálisis enzimática, teoría de la velocidad macromolecular

Introducción. La dependencia de la catálisis sobre la temperatura se puede explicar con las ecuaciones de Arrhenius y Eyring, pero en la catálisis biológica estas ecuaciones tienen una limitante, ya que las enzimas pierden actividad por arriba de su Temperatura óptima (T_{opt}), un fenómeno no atribuible a su desnaturalización, ya que en la mayoría de los casos ocurre a temperaturas más altas. Trabajos recientes han explicado este comportamiento incorporando nuevos parámetros termodinámicos a la ecuación, como la dependencia del cambio de energía libre del estado de transición sobre la temperatura (1,2). La cual se rige por el cambio en la capacidad calorífica (C_p) entre los estados basal y de transición (ΔC_p^\ddagger), actuando como un reservorio energético a través de sus modos vibracionales para la estabilización del estado de transición favoreciendo así la catálisis.

El objetivo del presente trabajo es contar con un modelo proteico dímérico, PaCIF, que permita la formación de un heterodímero (Hd) para poder modificar la C_p de uno de sus monómeros, utilizando a la otra subunidad como reportero del efecto que el cambio en la energía vibracional de la enzima tiene sobre su capacidad calorífica, inferido a través de la dependencia de la catálisis sobre la temperatura.

Metodología. Expresión y purificación de dos dímeros de la epóxido hidrolasa de *Pseudomonas aeruginosa* (PaCIF); un dímero inactivo (D129S) que posee un tag-6his, y el dímero activo fusionado a una MBP (proteína de unión a maltosa). Optimización de las condiciones de desnaturalización con Gnd-HCl y replegamiento de una mezcla equimolar de ambas proteínas para la obtención de heterodímeros funcionales. Purificación de los heterodímeros a través de un doble paso de purificación por columnas de afinidad (níquel y amilosa). Realización de curvas de Michaelis-Menten mediante el ensayo de hidrólisis de EBH (3), para la determinación de parámetros cinéticos y su comparación con los del dímero silvestre (4). **Resultados.** Se disociaron cantidades equimolares de ambos dímeros (D129S-6his y MBP-WT) a diferentes concentraciones de Gnd-HCl, y se replegaron en un

buffer adecuado en la presencia y ausencia de arginina, lográndose separar el Hd formado mediante purificación secuencial a través de las dos columnas de afinidad con un rendimiento del 50% relativo a los homodímeros, aunque con una pérdida significativa de proteína por agregación. Para los ensayos de actividad se estandarizó: la cantidad de sustrato (EBH), tiempos de reacción y cantidad de enzima para la caracterización cinética del Hd y se hizo la comparación entre el homodímero silvestre anteriormente caracterizado, encontrándose una actividad específica menor a la esperada, aunque la K_m permaneció prácticamente sin cambios.

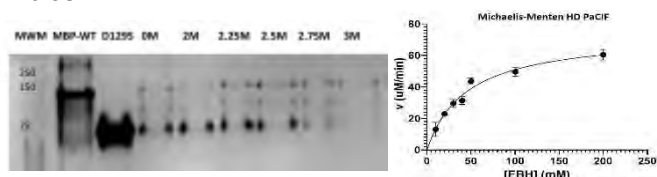


Fig. 1. (Izq)Gel nativo del replegamiento del HD en B500 a diferentes concentraciones de Gnd-HCl. (Der) Curva de Michaelis-Menten del Hd de PaCIF a 37°C.

Conclusiones. (1) La enzima PaCIF mostró un replegamiento parcialmente reversible, (2) Se logró obtener el Hd después de desplegar a 2.5M de Gnd-HCl y replegar en buffer B500, (3) la eficiencia catalítica entre PaCIF WT y Hd difiere porque no se logra replegar correctamente, dando lugar a un sitio activo deficiente, aunque aún funcional. Con estos parámetros como referencia, el sistema puede ser útil para estudiar el efecto de la T en k_{cat} y así inferir el efecto del cambio de masa del sistema en **Agradecimiento.**

Este trabajo fue financiado por DGAPA-UNAM (PAPIIT Grant No. IN211020 y IN226623 a G.S.R.),

Bibliografía.

- Hobbs, J., Jiao, W., Easter, A., Parker, E., Schipper, L., Arcus, V. (2013), *ACS CB*, 8, 2388-2393.
- Jones, H., Crean, R., Matthews, C., Troya, A., Danson, M., Bull, S., Pudney C. (2018), *ACS CB*, 8, 5340-5349.
- Bahl, C., Hvorecny, K., Bomberger, J., Stanton, B., Hammock, B., Morrisseau, C., Madden D. (2015), *ACI*, 54, 9881-9885.
- Jalomo, E., (2020), Caracterización del desplegamiento y comportamiento cinético de una proteína dímérica para su uso como herramienta en la evaluación del efecto de la capacidad calorífica sobre la catálisis enzimática, Tesis de maestría, UNAM, México.

STRUCTURAL STUDY OF LIPASE 2 OF *Pseudomonas alcaligenes*

Lizbeth García^{1,2}; Liliana Pardo², Enrique Rudiño², 1: Instituto de Biotecnología, UNAM. 2: Centro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, UAEM. Cuernavaca, México.62210.

Keywords: lipase, refolding, protein structure

Introduction:

Lipases are enzymes that catalyze the hydrolysis of triacylglycerides and whose products are fatty acids and glycerol. These enzymes have a catalytic triad consisting of serine, an acid residue (glutamic acid or aspartic acid), and histidine. *Pseudomonas* lipases are used in many areas of biotechnology, nevertheless, the expression and soluble production of these enzymes become a challenge for their study and commercialization. This is because *Pseudomonas* lipases require a foldase protein, called lif, which is responsible for folding the lipase to a native state. Due to this, 3 main strategies have been followed to obtain soluble and active enzymes. The first consist in using a dual expression system for cloning the gene of lipase and the foldase lif. The second consist in using a co-expression systems. And the third strategy consist in using a refolding assisted by the foldase lif.

Methodology

We followed the next steps for protein analysis:

- Protein expression
- 96-well plate folding screen design
- Protein purification
- Enzymatic assay
- Crystallization

Results

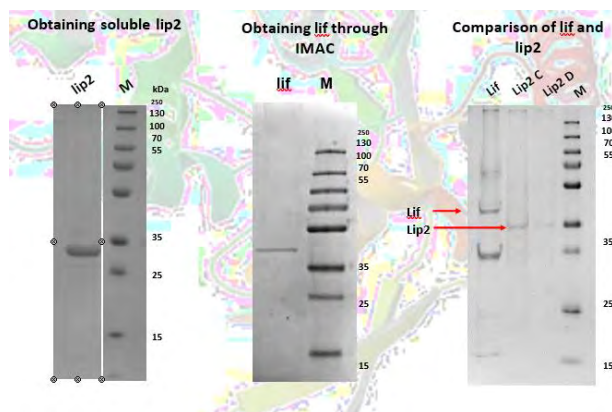


Fig. 1. Lif was solubilized with 8M urea. Lis was purified with IMAC chromatography. Its purity was evaluated using SDS-PAGE 12%.

Process of purification

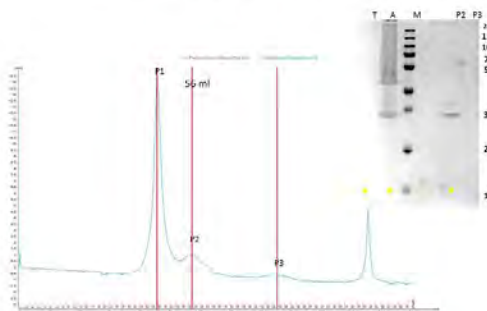


Fig. 2. The mix lip2-lif refolded was purifies through IMAC chromatography and SEC

Design, Refolding, and screening phase of lip2 in the presence of Lif in 96 well plate format

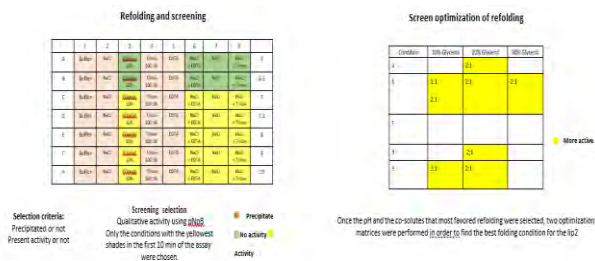


Table 1. The proportion of lif concerning lip2 also varied during the screen. Lig was used in a 2:1 and 1:1 ratio concerning lip2

Conclusion

The refolding protocol is available to get a soluble and active Lip2 enzyme. Lip2 has a preference for short-chain pNP, specially acetate pNP as substrate

Acknowledgements

An acknowledgement to CIGoM, IBt- UNAM and CIDC-UAEM.

Bibliography

1. Azeem, F., Afzal, M., Javed, S., Riaz, M., Kouser, A., Hussain, S., Nadeem, H. (2017). *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132, 23–34
2. Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A., & Sandoval, G. (2018)
3. Nardini, M., Lang, D. A., Jaeger, K.-E., Liebeton, K., & Dijkstra, B. W. (2002).. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31219– 31225.

INMUNOINFORMATICS EVALUATION OF IMMUNOGENIC EPITOPES OF EhADH FROM *Entamoeba histolytica* AS A VACCINE CANDIDATE AGAINST AMOEBIASIS. Kenia-Pantoja¹, Sarita Montaña¹, Claudia León-Sicairos¹, Esther Orozco² and Rosario Javier Reyna².

¹Laboratorio de Bioinformática y Simulación Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. ²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. keniapantoja.fcqb@uas.edu.mx

Entamoeba histolytica is an invasive organism that requires the participation of multiple proteins to cause damage to host cells. A protein complex (EhCPADH), formed by a cysteine proteinase (EhCP112) and an adhesin (EhADH), is involved in pathogenicity this parasite. Due to the participation of EhADH in different cellular mechanisms, this protein is being carefully explored to find sequences that could be new targets against amoebiasis. In this project, we explore the immunogenic characteristics of EhADH peptides to propose vaccine candidates against amoebiasis. We developed immunoinformatics research to evaluate the candidate's peptides. Toxicity, antigenicity, and allergenicity of at least three EhADH peptides were evaluated using immunoinformatic tools. The results showed that the peptide sequence: KFRQFENDIKLLCEGNIQ is an excellent candidate peptide to develop a possible vaccine against amoebiasis. This peptide was immunized in the hamster animal model to evaluate the protection conferred against the development of amoebic liver abscess. The results showed that the vaccinated hamster group generated two times more protection than the control group that was not vaccinated.

ISOLATION OF THE ZIKA VIRUS AND FRAGMENTS OF THE HUMAN CYTOPLASMIC DYNEIN-1 FOR STRUCTURAL STUDIES

Dulce Carolina Lugo Gil y Edgar Morales Ríos, Centro de investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Bioquímica, Av IPN 2508, San Pedro Zacatenco, 07360, CDMX, Tel.: 5557473800 ext. 5234. edgar.morales@cinvestav.mx

Key words: ZIKV, Dynein-1, interface.

Introduction. Zika virus (ZIKV) is an RNA virus of the Flavivirus genus, it was first isolated in 1947 in the woods of Zika in Oriental Africa, however, it is now infecting humans in Mexico, Central and South America. ZIKV is transmitted primarily by mosquito's bite. In symptomatic infections (20%), the main symptoms are rashes, arthralgia, conjunctivitis, myalgia, headache, retro-orbital pain (1). However, some cases go on to develop more serious conditions such as microcephaly and Guilliam-barré syndrome. Currently, there is no specific treatment or vaccines approved to treat or prevent ZIKV infection. ZIKV is formed by a lipid bilayer, a positive sense RNA (ARN+) genome, the structural proteins capsid (C), membrane protein (M), envelope protein (E) and seven non-structural proteins (2). ZIKV hijacks human dynein to move through microtubules during its replication process. In our lab, we have demonstrated that ZIKV virions interact directly with NTD and NDD fragments of Dynein's Heavy Chain (3).

This research mainly objective is to expand the knowledge through the study of the binding interface between ZIKV and dynein through structural biology in order to explore potential molecules that could potentially interfere in this interface for the development of specific treatment to stop ZIKV's replication cycle and in consequence, the infection caused by this virus.

Methods. In this part of the project, we initially expressed and purified recombinant dynein fragments NTD and NDD by affinity and size exclusion chromatography. ZIKV was obtained from *Aedes albopictus* C6/36 cells and purified by size exclusion chromatography. The purified elements were observed through transmission electron microscopy with negative stain using uranyl acetate, using a JEM-4501 double beam microscope.

Results. Recombinant dynein fragments NTD and NDD were expressed and purified as a single band, with a yield of 29 and 38 mg per liter respectively (Figure 1a). Also, ZIKV was obtained from cells with a yield of 75×10^6 viral particles per mL (Figure 1b). This material was purified and the fractions from the gel

filtration were processed to obtain images of the virus using electron microscopy (Figure 1c).

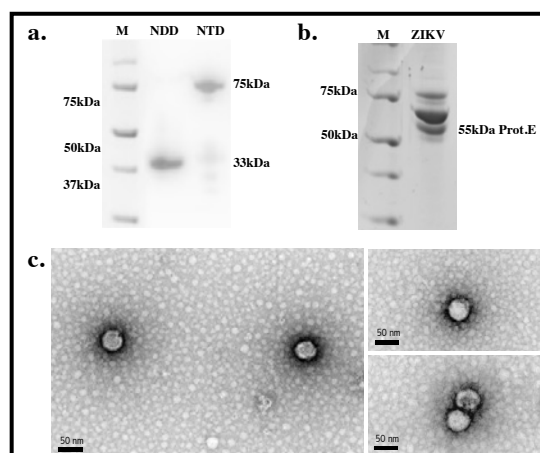


Fig. 1. a. Dynein fragments NTD and NDD in SDS-page. b. ZIKV obtained from C36/36 cells. c. Negative stain electron microscopy analysis of ZIKV purified samples.

Conclusions. We have purified NTD, NDD dynein fragments as well as Zika viral particles. We are currently working to find the optimal conditions to observe ZIKV decorated with NTD and NDD by negative-stain electron microscopy.

With these optimal conditions we will solve the near atomic resolution of the ZIKV-Dynein interface.

Acknowledgment. Q.F.B. Sirenia Gonzales Pozos for her technical support in the use of the NS electron microscope.

Bibliography:

1. Dick GW, Kitchen S, Haddow A. (1952) *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Vol 46(5): 509–20.
2. Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. (2004) *Proc Natl Acad Sci.* Vol: 9;101(10): 3414–9.
3. Zavala-Vargas DI, Visoso-Carbajal G, Cedillo-Barrón L, Filisola-Villaseñor JG, Rosales-Ramirez R, Ludert JE. (2023) *Virol J* Vol: 6;20(1): 43.

**IDENTIFICACIÓN DE FÁRMACOS PARA SU REPOSICIONAMIENTO COMO
INHIBIDORES DE LCK EN TERAPIA CONTRA CÁNCER**

Diana Paola Rojas González, Luis Jesús Córdova Bahena, M. Antonio Velasco Velázquez.
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad Universitaria C.P.04515, dianarogo1@gmail.com

Palabras clave: reposicionamiento, in silico, antineoplásico

Introducción. La tirosina cinasa Lck participa en la activación y diferenciación de las células T [1]. Se ha demostrado su sobreexpresión y sobreactivación en células de distintos tipos cáncer [1,2] y su presencia se ha relacionado con la activación de diferentes vías de señalización, así como con la sensibilidad de las células cancerosas al tratamiento farmacológico [3,4]. En consecuencia, Lck se ha propuesto como nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de cáncer [5].

Metodología. Utilizando herramientas *in silico*, se caracterizó el modo de unión de un grupo de inhibidores de Lck y se propuso una estrategia de cribado virtual para identificar fármacos que emulen el comportamiento de los inhibidores estudiados.

Resultados. En los sistemas Lck-inhibidor ocurren 8 interacciones importantes con los residuos de Lck (Fig.1). La energía de unión de estos sistemas oscila entre los -288.7 a -320.3 kJ/mol.

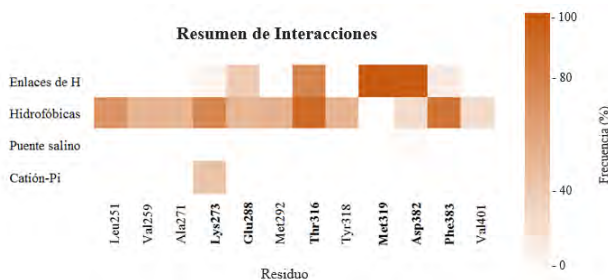


Fig. 1. Resumen de interacciones moleculares en los sistemas Lck-inhibidor. Los residuos resaltados participan en interacciones con alta frecuencia de aparición.

Se propuso un modelo de farmacóforo (MF) que consta 8 elementos clave (Fig. 2A). El vasodilatador Udenafil empata con 6 de los 8 elementos esperados (Fig.2B)

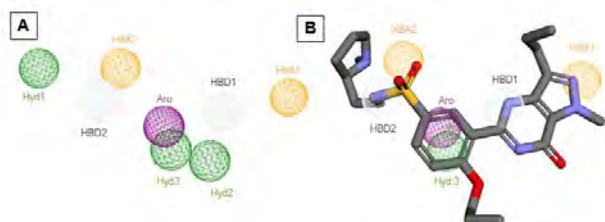


Fig. 2. A. MF propuesto para potenciales inhibidores de Lck. Aceptor de hidrógeno (HBA), donador de hidrógeno (HBD),

hidrofóbico (Hyd), aromático (Aro). B. Confórmero de Udenafil identificado en el servidor Pharnit

Udenafil imita el modo de unión de los inhibidores control con un RMSD de 2.6. Una vez acoplado su RMSD, durante 150 ns, es igual a $3.6 \text{ \AA} \pm 0.4 \text{ \AA}$. Udenafil genera 3 enlaces de hidrógeno con Asp382 y con Lys273 (Fig.3) así como interacciones hidrofóbicas con Phe383 y Thr316. En un 30% de frecuencia ocurre un puente cation-Pi con Lys273.

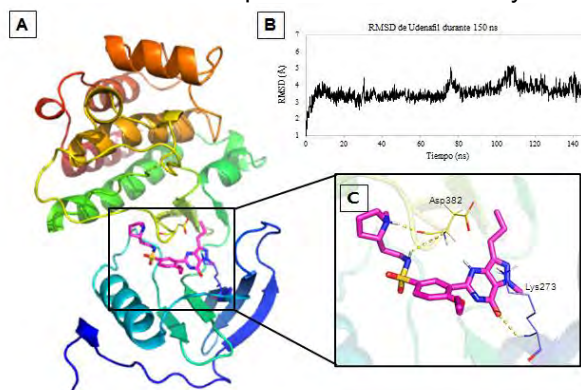


Fig. 3. A. Complejo Lck-Udenafil. B. RMSD de Udenafil en Lck durante 150 ns. C. Enlaces de hidrógeno que ocurren entre los residuos de Lck (Asp382 y Lys273) y el fármaco.

Finalmente, la energía de unión calculada para el sistema Lck-Udenafil es de $-318.6 \text{ kJ/mol} \pm 27.6 \text{ kJ/mol}$.

Conclusiones. Se identificó que Udenafil presenta alta afinidad por Lck con una buena estabilidad y emula el comportamiento de inhibidores de Lck ya reportados. Nuestros resultados alientan el estudio y evaluación de Udenafil como posible agente antineoplásico.

Bibliografía.

- Bomhardt, U., Schraven, B., & Simeoni, L. (2019). *Int J Mol Sci*, 20(14).
- Han, M., Li, Y., Guo, Y., Zhu, W., & Jiang, J. (2022). *Int J Mol Sci*, 23(22)
- Serafin, V., Capuzzo, G., Milani, G., Minuzzo, S. A., Pinazza, M., Bortolozzi, R. Accordi, B. (2017). *Blood*, 130(25), 2750-2761
- Zhang, J., Wu, Y.-J., Hu, X.-X., & Wei, W. (2023). *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11.
- Till, K. J., Allen, J. C., Talab, F., Lin, K., Allsup, D., Cawkwell, L., Slupsky, J. R. (2017). *Sci Rep*, 7(1)


ENSAYO DE DOCKING MOLECULAR CON 4 NEUROTOXINAS PRESENTES EN DIFERENTES GRUPOS TAXONÓMICOS ASOCIADAS CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer promueve la destrucción de la neurona cerebral, en relación con la aparición tanto de depósitos extracelulares insolubles (placas amiloides) como intracelulares (ovillos neurofibrilares). La enzima acetilcolinesterasa es la responsable de hidrolizar la acetilcolina, neurotransmisor que participa en los impulsos nerviosos una vez que se desprende de sus respectivos neuroreceptores. Por ende, los inhibidores de acetilcolinesterasa son necesarios para regular de manera óptima los niveles colinérgicos en el cerebro. Por otra parte, existen neurotoxinas que inhiben selectivamente la acetilcolinesterasa de los peces eléctricos y mamíferos, teniendo una gran utilidad en la investigación farmacológica, estos arreglos peptídicos pueden aumentar la concentración colinérgica a nivel sináptico, promover la degradación de acetilcolinesterasa y favorecer la elevación de los niveles de acetilcolina en la hendidura sináptica. En este estudio se realizó un ensayo de acoplamiento molecular empleando herramientas bioinformáticas para poder predecir energías de interacción proteína-ligando con neurotoxinas capaces de inhibir la acetilcolinesterasa. Con un valor de -477.21 la fasciculina 2, reporta la menor energía de unión, seguida de la α -Bungarotoxina con -302.28 y en tercera posición la Haditoxina exhibiendo -258.77. Todo parece indicar que la fasciculina presenta mayor afinidad debido a que se une a un sitio periférico en AChE, una región distinta del centro catalítico y ubicada en el borde del desfiladero del sitio activo.

Palabras clave: Neurotoxinas, Alzheimer, docking molecular, blanco proteico.


Dra. Dulce Estefanía Nicolás Álvarez
Asesor con grado Académico
Nombre y firma


Dr. Andrés Reyes Chaparro
Coasesor con grado Académico
Nombre y firma

EXPRESSION OF THE DIABETES TYPE 2 RELATED TRANSPORTER MCT11

Moreno Licon Nicole Justine, Olin Sandoval Viridiana, Morales Ríos Edgar. CINVESTAV Zacatenco, Departamento Bioquímica. Ciudad de México, C.P. 07360. Correo electrónico: viridiana.olin@cinvestav.mx, edgar.morales@cinvestav.mx.

Key words: SNP's, Transport, SLC16A11.

Introduction. The MCT11 transporter is one of 14 members of the monocarboxylate transporter family (MCT) (1). In 2014, the SIGMA Type 2 Diabetes (T2D) Consortium identified a new risk haplotype (consisting of 5 SNPs) for developing T2D, in the coding region of the *MCT11* gene (SLC16A11) (2). The substrate and function of MCT11 has not been completely characterized. In a previous work we identified the substrates candidates for the MCT11 transporter *in silico* in a molecular model of MCT11 (3). Now we are proposing to express and purify the MCT11 for the experimental validation of the *in silico* results by binding assays using thermostability tests.

Methodology. In this part of the project, we worked on the optimization of the expression of MCT11 in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by subcloning the SLC16A11 gene fused to a His tag, in their respective expression plasmids. The expression was induced with IPTG or galactose/raffinose, respectively, standardizing the incubation at different temperatures and induction times. Then, we verified the expression of MCT11 by Western Blot, using anti-His tag antibodies.

Results. In order to experimentally validate the docking results we obtained previously (3), we focused in expressing the MCT11 in *E. coli* and *S. cerevisiae*. Until now, our expression systems allowed us to identify *S. cerevisiae* as a better expression system for our protein. Our results in *E. coli* indicate that at different induction times there is expression of a lower molecular weight MCT11, suggesting that the protein is truncated (Fig. 1A). We carry out various induction tests modifying the concentrations and induction times with IPTG, as well as different degrees of temperature (data do not show). In contrast, when we use the *S. cerevisiae* expression system with the optimized gene, we observe expression of MCT11 in total lysated cells from two hours to 16 hours after induction (fig. 1B).

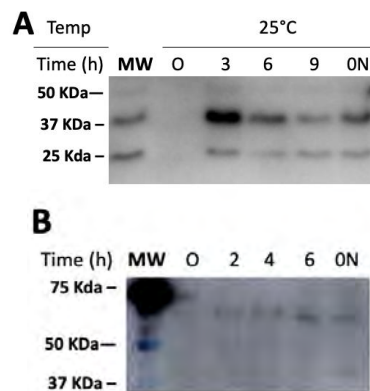


Fig. 1. Expression of MCT11. **A.** Western Blot of the expression of the truncated transporter in bacteria *E. coli* at different times. **B.** Western Blot of the expression in *S. cerevisiae*.

Conclusions. The results obtained so far allowed us to identify that the eukaryotic expression model (yeast *S. cerevisiae*) shows an expression signal at the molecular weight expected for MCT11. This will give us guidelines to purify the overexpressed protein in macro-cultures. Subsequently, the purification can be carried out isolating the protein solubilized with detergent by His affinity columns. Finally, the purified protein will allow us to perform thermostability tests, to validate the candidate substrates previously identified in molecular docking.

Acknowledgment. We thank to CINVESTAV and CONACyT for its funding.

References.

1. Felmler M., Jones R., Rodriguez V., Follman K., Morris M. (2020) *Pharmacol Rev.* Vol (72): 466–485
2. The SIGMA Type 2 Diabetes Consortium. (2014) *Nature* Vol (506): 97–101.
3. Moreno N., Morales E., Olin V. (2022) FINDING THE SLC16A11 SUBSTRATE BY STRUCTURAL MODELING. *Memorias XXXIII National Congress of Biochemistry.* SMB. Mérida Yucatan, 302.

BEYOND THE DIMER: OLIGOMERIC STUDY OF CATECHOL 1,2 DIOXYGENASE FROM *Stutzerimonas stutzeri* GOM2

Arisbeth G. Almeida-Juárez¹; Liliana Pardo-López¹, Shirish Chodankar², Enrique Rudiño-Piñera¹,

1: Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, México. C.P.62210.

2: Brookhaven National Laboratory NSLS-II. Upton, New York. 11973-5000

ariisalmeida@gmail.com

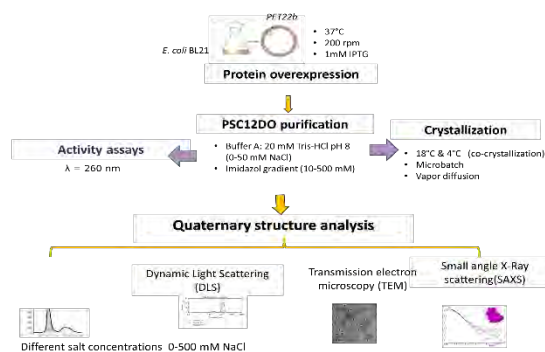
Keywords: SAXS, quaternary structure, protein structure

Introduction:

In 2015, a strain of *S. stutzeri* capable of growing in the presence of oil was isolated from the southwestern Gulf of Mexico¹. This strain, *S. stutzeri* GOM2 presents many enzymes involved in the aerobic degradation of aromatic compounds, specifically benABC operon enzymes. One of the enzymes involved in the degradation of aromatic compounds is catechol 1,2-dioxygenase. This intradiol-type dioxygenase is Fe (III) dependent and participates in the oxidation of catechol or other catechol substituents². In difference to all catechol 1,2 dioxygenases of *Pseudomonas* reported (dimers) to date³, we found that C12DO in low ionic conditions is active as a trimer¹.

In this work, we aim to determine the tridimensional structure of C12D in both oligomeric states by X-ray crystallography and SAXS.

Methodology



Results

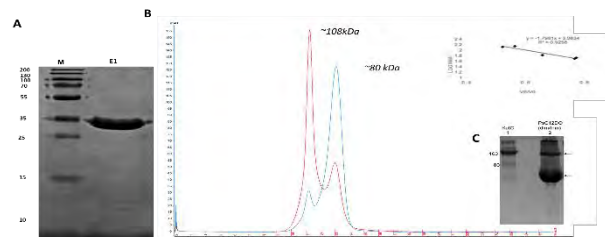


Fig. 1. (A) SDS-PAGE of purified Psc12DO. M - molecular weight ladder. E1- purified Psc12DO. **(B)** Chromatogram showing the elution profile of Psc12DO (~108 kDa- trimer) (~80 kDa- dimer) **(C)** Semipreparative PAGE 12% of Psc12DO (dim-trim) and KatG from *M. tuberculosis*

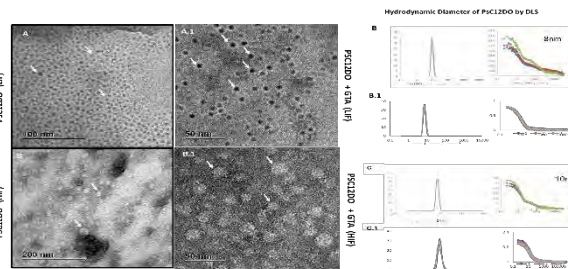


Fig. 2. (A) Electron micrography of Psc12DO in Low ionic Force conditions (LIF) 80K.) Hydrodynamic diameter (nm) of Psc12DO +HIF, **(B.1)** Hydrodynamic diameter (nm) of Psc12DO +GTA -HIF **(C)** Hydrodynamic diameter (nm) of Psc12DO -LIF **(C.1)** Hydrodynamic diameter (nm) of Psc12DO+GTA - LIF

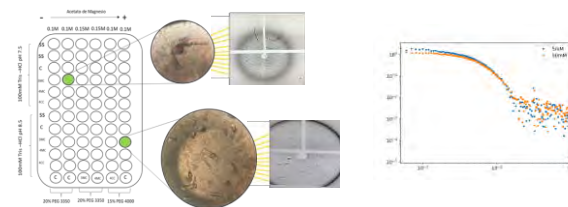


Fig. 3. Psc12DO crystals were diffracted at 2.5 -2.9 Å (LANEM, IQ-Mexico) , all crystals showed high mosaicity. Microbatch 18°C-4°C [20mg/ml] substrate-catechol- 2:1 (prot-pre). 0.15 M Magnesium acetate tetrahydrate, 01 M Tris-HCl pH 7.5, 20% (v/v) PEG 3350 + HFIP

Conclusion

C12DO presents more than one oligomeric state and maintains its activity

Acknowledgements

This project was supported by CONACYT – Programa de Becas Nacionales

Bibliography

- Rodriguez-Salazar, J. Almeida-Juarez, A.G. Ornelas-Ocampo, K. Millan-Lopez, S. Raga-Carbajal, E. Rodriguez-Mejia, J.L. Muriel-Millan, L.F. Godoy-Lozano, E.E. Rivera-Gomez, N. Rudino-Pinera, E. Pardo-Lopez, L. 2020. Characterization of a Novel Functional Trimeric Catechol 1,2-Dioxygenase From a *Pseudomonas stutzeri* Isolated From the Gulf of Mexico *Frontiers in Microbiology*, 11, 1100
- Dijk, J. A.; Stams A. J. M.; Schraa G.; Ballerstedt H.; De Bont J. A. M.; Gerritse J. 2003. Anaerobic oxidation of 2-chloroethanol under denitrifying conditions by *Pseudomonas stutzeri* strain Applied Microbiology and Biotechnology. 63:68-74
- Micalella C., Martignon S., Bruno S., Pioselli B., Caglio R., Valetti F., et al. (2011). X-ray crystallography, mass spectrometry and single crystal microspectrophotometry: a multidisciplinary characterization of catechol 1,2 dioxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1814 817–823.

Introducción. La irreversibilidad del desplegamiento/replegamiento *in vitro* en las proteínas es un fenómeno que dificulta la determinación de parámetros termodinámicos tales como ΔH , ΔC_p y ΔG , así como la obtención de proteína recombinante correctamente plegada. La estructura residual se define como la estructura secundaria que permanece plegada en condiciones desnaturalizantes. En algunos casos las proteínas con estructura residual son más propensas a la agregación y/o a la irreversibilidad del desplegamiento por temperatura [1], en otros casos su presencia puede mejorar la termoestabilidad [1]. Aunque la relación entre irreversibilidad y estructura residual no es clara, éste trabajo pretende aportar conocimiento que ayude a la comprensión integral de esta relación. Para lograr dicho objetivo, se empleará como modelo de estudio a la colección de barriles TIM diseñados *de novo* llamados “NovoTIM” [2].

Se determinará el papel de la estructura residual en la estabilidad y en la irreversibilidad del desplegamiento térmico en los barriles NovoTIM.

Metodología. A partir de simulaciones de dinámica molecular (MD) y mediante mutagénesis dirigida se construyeron mutantes que perturban los núcleos hidrofóbicos de la proteína NovoTIM13. Para estudiarlas *in vitro* se utilizó dicroísmo circular (CD) calorimetría diferencial de barrido (DSC) e intensidad de fluorescencia (IF). Para estudiarlas *in silico* se utilizó MD, Aggrescan (predicción de solubilidad) y ProteinTools (identificación de núcleos hidrofóbicos).

Resultados.

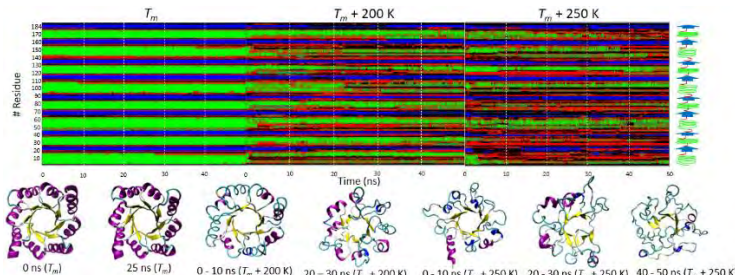


Fig. 1. Evolución estructural de NovoTIM13 en dinámica molecular a altas temperaturas. Gráficos de evolución estructural de cada residuo a lo largo de 50 ns de simulación a la T_m (92.8 °C), a la $T_m + 200$ K y a la $T_m + 250$ K. Las franjas azules son alfa hélices, las franjas verdes son hebras beta y las franjas rojas son asas o regiones desestructuradas. A la derecha se encuentra una representación en caricatura de estos elementos estructurales. Debajo hay una representación en caricatura de NovoTIM13 a los 0, 25 y 50 ns a cada temperatura simulada. Las hebras β permanecen mayormente estructuradas y son ricas en residuos de ILV que son los responsables de la formación de núcleos hidrofóbicos y su permanencia a altas temp. [3].

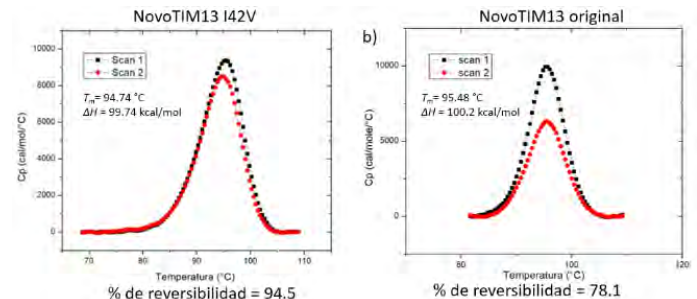


Fig. 2. Reversibilidad de la mutante I42V. Comparación del porcentaje de reversibilidad de la mutante NovoTIM13 I42V comparado con la proteína parental. El primer scan y segundo scan están representados con puntos negros y rojos respectivamente. La T_m y ΔH son del primer scan. La vel. de barrido es 90 °C/h con buffer 35 mM de fosfato de sodio y 50 mM de NaCl. La temperatura va de 10 a 110 °C.

La figura 1 muestra que la región del núcleo conformado por hebras β , es la que permanece mayormente estructurada durante el desplegamiento térmico y es muy probable que el estado desnaturalizado dominante sea el que mantiene el núcleo estructurado (presencia de estructura residual). A partir de este dato se construyeron 8 mutantes que desestructuran la zona del núcleo y evitan la formación de estructura residual. La figura 2 muestra la endoterma de la mutante I42V con el núcleo perturbado. Esta mutante logra aumentar el porcentaje de reversibilidad de 78.1 a 94.5 %, lo que muestra una relación entre la estructura residual y la irreversibilidad del desplegamiento térmico. Análisis posteriores son necesarios para entender esta relación con mayor profundidad.

Conclusiones. Una mayor flexibilidad del núcleo hidrofóbico de NovoTIM13 produce un mayor porcentaje de reversibilidad del desplegamiento térmico.

Agradecimiento. Al programa de becas para estudios de posgrado (doctorado) del Consejo Nacional de Humanidades, ciencias y tecnologías (CONAHCYT).

Bibliografía.

- 1- Robic S., Guzman M., Sanchez R. and Marqusee S. (2003) *Role of residual structure in the unfolded state of a thermophilic protein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 11345-11349.
- 2 - Romero S., Costas M., Silva D., Kordes S., Rojas E., Tapia C., Guerra Y., Shanmugaratnam S., Rodríguez A., Baker D., Höcker B. and Fernández A. (2021) *The Stability Landscape of de novo TIM Barrels Explored by a Modular Design Approach.* Journal of Molecular Biology. USA, 433(18) 167153.
- 3 - Ratcliff K. and Marqusee S. *Identification of Residual Structure in the Unfolded State of Ribonuclease H1 from the Moderately Thermophilic Chlorobium tepidum: Comparison with Thermophilic and Mesophilic Homologues* (2010). Biochemistry 49(25), 5167-5175.

HIALURONIDASA DEL VENENO DE ABEJAS: PRODUCCIÓN HETERÓLOGA Y POSIBLES APLICACIONES

Pedro Antonio Ruiz-de la Rosa, Mayra Avelar, Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bioquimioinformática (LSAyB), Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, 98160, 35164165@uaz.edu.mx.

Palabras clave: hialuronidasa, ácido hialurónico, veneno de abeja.

Introducción. La hialuronidasa es una enzima que hidroliza el ácido hialurónico, lo que provoca un aumento en la dispersión de los líquidos que se inyectan en los tejidos y facilita su absorción (1). Esta enzima se puede clasificar en 3 grupos dependiendo de donde se produce: i) mamíferos, ii) veneno de animales y iii) microbianas. Adicionalmente, también se pueden dividir en 2 grupos de acuerdo con la actividad enzimática dependiente del pH, los cuales se resumen en: hialuronidasas ácidas que son activas en un pH entre 3 y 4, en las cuales se encuentra la hialuronidasa de humano, y las hialuronidasas neutras que son activas en un pH entre 5 y 8 (2). En estas últimas se encuentra la hialuronidasa proveniente del veneno de abeja, la cual es el objeto de estudio de esta investigación.

En este trabajo se abordarán temas relacionados con el mecanismo de acción de la hialuronidasa, sus potenciales aplicaciones, su expresión heteróloga y sus particularidades estructurales.

Metodología. Se realizó una investigación bibliográfica en buscadores como Google académico, NIH y Scielo. La información obtenida se compiló de varios artículos y revistas científicas enfocadas en un punto de vista biotecnológico, donde se exploran varios métodos acerca de la hialuronidasa de veneno de abeja y sus posibles aplicaciones.

Resultados. La enzima hialuronidasa, presente en el veneno de abeja, tiene la capacidad de descomponer el ácido hialurónico. Su función principal es actuar como un agente de difusión, lo que significa que facilita la dispersión del veneno a través de los tejidos (1). Esta enzima tiene varios usos en la medicina estética como en la eliminación de depósitos de ácido hialurónico, en el tratamiento de reacciones inflamatorias o granulomatosas crónicas, en la prevención de necrosis tisular tras la inyección de relleno, en la eliminación del efecto Tyndall y como anestésico local (3).

Se ha reportado la expresión heteróloga de esta enzima en *Escherichia coli*, en células de insecto-baculovirus y en *Komagataella pastoris*. En este sentido, en *Escherichia coli* la producción recombinante de la hialuronidasa de veneno de abeja se ha reportado como una proteína de inclusión; por

otro lado, se ha establecido el uso de células de insecto-baculovirus, también para su expresión heteróloga en células *Spodoptera frugiperda* (4). Adicionalmente, en *Komagataella pastoris* esta proteína se expresa como una glicoproteína extracelular (5).

En cuanto a la estructura cristalográfica de la hialuronidasa del veneno de abejas, que presenta un 30% de identidad con la hialuronidasa humana, la topología se asemeja a un barril (β/α)₈, el cual es un tipo de arquitectura muy recurrente en enzimas y que se describió por primera vez para la triosafosfato isomerasa (TIM). Sin embargo, en el caso de la hialuronidasa del veneno de abeja, el barril está compuesto solo por siete hélices y existe una cavidad en el extremo C-terminal de la secuencia de la proteína (6).

Conclusiones. La hialuronidasa del veneno de abeja es una enzima que aún no está explorada del todo, pero que podría tener posibles aplicaciones para lo que se requieren mayores estudios para producirla en mayor grado de pureza. Además, esta enzima puede tener efectos adversos, por lo que se tendría que explorar aún más para posibles mejoras de ésta.

Agradecimiento. Los autores agradecen al LSAyB por las facilidades para realizar este trabajo. MA agradece a CONAHCYT por la beca posdoctoral, 364335.

Bibliografía.

1. Carpena, M., Nuñez_Estevez, B., Soria-Lopez, A. & Simal-Gandara, J. (2020), *Nutrients*, 12(11):3360.
2. Girish, K.S. & Kemparaju K. (2007), *Life Sci.*, 80:1921-1943.
3. Ulecia Metz, M., (2014), *Medicina estética.*, 40 (3): 30-35.
4. Soldatova, L. N., Cramer, R., Gmachl, M., Kemeny, D. M., Schmidt, M., Weber, M., & Mueller, U. R. (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.*, 101 (5):291-698.
5. Reitinger, S., Boroviak, T., Laschober, G. T., Fehrer, C., Müllegger, J., Lindner, H., Lepperdinger, G. (2008) *Protein. Expr. Purif.*, 57 (2):226-33.
6. Marković Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Pierre Rizkallah, J., Müller, U., Schirmer, T., (2000) *Structure*, 8 (10): 1025-1035.

ESPECIFICIDAD POR EL SUSTRATO ALDEHÍDO DE LA ENZIMA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA PA2125 DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Gustavo Abraham Valero Pibara¹, Carlos Mújica Jiménez¹, Javier Andrés Juárez Díaz², Rosario Adelaida Muñoz Clares¹, ¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, ²Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, C.P. 04510, clares@unam.mx

Palabras clave: aldehídos aromáticos; relaciones estructura/función; rutas metabólicas novedosas.

Introducción. Las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDHs) catalizan la oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos utilizando NAD(P)⁺. *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria ubicua, que puede ser patógena para plantas y animales, posee una gran flexibilidad metabólica que le permite crecer en una amplia diversidad de compuestos orgánicos. Muchas de sus rutas metabólicas, y de las enzimas participantes en estas rutas aún no se han estudiado, siendo un ejemplo de ello la mayor parte de las 23 ALDH que posee, entre ellas la PA2125. Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que esta enzima oxida aldehídos aromáticos derivados del benzaldehído. El objetivo de este estudio es conocer el papel de los residuos no catalíticos de su sitio activo en el reconocimiento de sus sustratos aldehído, centrándonos en el estudio del residuo Ser150.

Metodología. La caracterización cinética con diferentes aldehídos se realizó por los métodos clásicos de velocidad inicial en estado estacionario. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente siguiendo el aumento de absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADH, a excepción del 2,5-dihidroxibenzaldehído (gentisalaldehído) para el que se midió la disminución de absorbancia a 400 nm. Para investigar el papel del residuo Ser150, se generó mediante mutagénesis sitio-dirigida la variante S150A, usando el kit Quick-Change (Agilent) y los oligonucleótidos apropiados.

Resultados. El benzaldehído y sus derivados son buenos sustratos de la enzima PA2125, destacando el 2,5-dihidroxibenzaldehído (gentisalaldehído) (Tabla 1). El cambio de Ser150 por alanina aumenta el valor de k_{cat}/K_m de los aldehídos con respecto a la enzima silvestre, pero no del gentisalaldehído, lo que refuerza nuestra idea de que éste pudiera ser el sustrato fisiológico, ya que no es de esperar que en el sitio activo se haya seleccionado un residuo que estorbe la unión del sustrato, sino que por el contrario la favorezca.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la proteína silvestre con los sustratos aldehído seleccionados.

| Sustrato | V_{max} (U mg ⁻¹ prot) | k_{cat} (s ⁻¹) | K_m (mM) | k_{cat}/K_m (s ⁻¹ M ⁻¹ × 10 ³) | K_i (mM) |
|----------------------------|--|---------------------------------|----------------|---|---------------|
| Benzaldehído | 17.5 ± 0.1 | 15.5 ± 0.1 | 2.47 ± 0.03 | 6.2 ± 0.3 | - |
| 3-Clorobenzaldehído | 24.8 ± 0.6 | 22.0 ± 0.5 | 0.40 ± 0.03 | 55.0 ± 0.4 | 9.9 ± 0.7 |
| 4-Clorobenzaldehído | 21.8 ± 0.6 | 19.4 ± 0.5 | 0.18 ± 0.01 | 97.0 ± 0.5 | 6.2 ± 0.4 |
| 3-Metoxibenzaldehído | 14.1 ± 0.3 | 12.5 ± 0.3 | 0.62 ± 0.06 | 20.8 ± 2.0 | - |
| 4-Metoxibenzaldehído | 5.4 ± 0.2 | 4.8 ± 0.2 | 2.34 ± 0.15 | 2.1 ± 0.2 | - |
| 3-Metilbenzalaldehído | 8.2 ± 0.1 | 7.3 ± 0.1 | 1.57 ± 0.05 | 4.6 ± 0.2 | - |
| 4-Metilbenzalaldehído | 12.8 ± 0.1 | 11.3 ± 0.1 | 1.49 ± 0.06 | 7.5 ± 0.3 | - |
| 3-Nitrobenzalaldehído | 10.0 ± 0.1 | 8.9 ± 0.1 | 0.37 ± 0.02 | 22.3 ± 1.0 | - |
| 4-Nitrobenzalaldehído | 13.1 ± 0.9 | 11.6 ± 0.8 | 0.59 ± 0.08 | 19.3 ± 2.9 | - |
| 3-Piridincarboxaldehído | 10.7 ± 0.3 | 9.5 ± 0.3 | 1.14 ± 0.06 | 8.6 ± 0.5 | - |
| *2,5-dihidroxibenzaldehído | 189.2 ± 6.7 | 168.4 ± 5.9 | 0.005 ± 0.0007 | 33,680.9 ± 4860.6 | - |

*Actividad medida por disminución de la absorbancia a 400 nm.

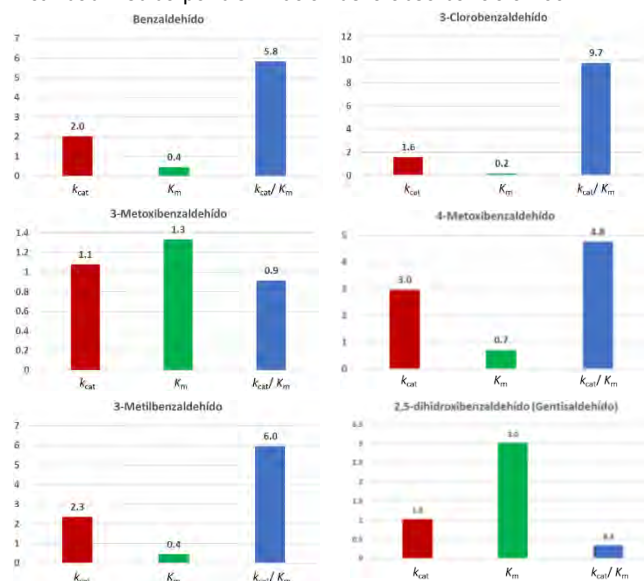


Figura 1. Cambios en los parámetros cinéticos de la variante S150A respecto a la enzima silvestre.

Conclusión. La enzima PA2125 parece haber evolucionado para usar como sustrato fisiológico al gentisalaldehído, que pudiera ser un intermediario en una novedosa ruta bacteriana de síntesis de patulina, un compuesto tóxico producido por hongos.

Agradecimientos. Al PAPIIT, UNAM, (Proyecto IN203423), por la financiación del proyecto, y al CONACYT por la beca de posgrado.

OPTIMIZACIÓN DE BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNA TIPO VIRUS FUSIONADA A PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Brenda Belén **Cruz García**, Armando Hernández García. Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología, Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, UNAM, 04510 Ciudad de México, México, armandohg@iquimica.unam.mx

Palabras clave: biosíntesis, proteína tipo virus, optimización

Introducción. En este proyecto buscamos biosintetizar una proteína tipo virus artificial, llamada “CSB”, conformada por tres bloques polipeptídicos y genéticamente fusionada con péptidos antimicrobianos. Estos bloques funcionan como una cubierta viral: el primer bloque “C” proporciona estabilidad coloidal, “S” se encarga del autoensamblaje cooperativo y “B” de la unión electrostática a ácidos nucleicos. ⁽¹⁾ Asimismo, al polipéptido CSB se le han adicionado secuencias de péptidos antimicrobianos (como aureína y mixinidina). ^(2, 3, 4) El propósito de este trabajo es mejorar el rendimiento de producción recombinante de estas proteínas en la levadura *Komagataella phaffii* (anteriormente conocida como *Pichia pastoris*).

Metodología. Se cultivan las cepas recombinantes de *K. phaffii* con los genes que codifican a las proteínas de interés, induciendo la expresión con metanol en distintas concentraciones de glicerol, metanol y pH. Posteriormente se purifica el medio que es donde se secretaron las proteínas mediante precipitación usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y acetona, lo obtenido se dializa y liofiliza. Para verificar su pureza y rendimientos, se hacen electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y se pesa lo obtenido en microbalanza, respectivamente. ⁽¹⁾

Resultados.

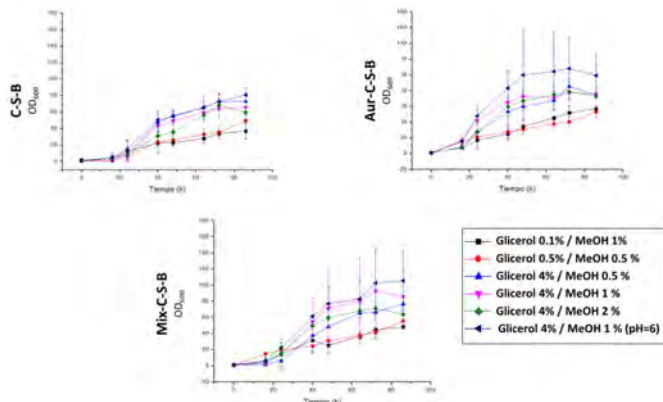


Fig. 1. Densidad óptica de las proteínas CSB, Mix-CSB y Aur-CSB en diferentes condiciones de glicerol (Gli) y metanol (MeOH).

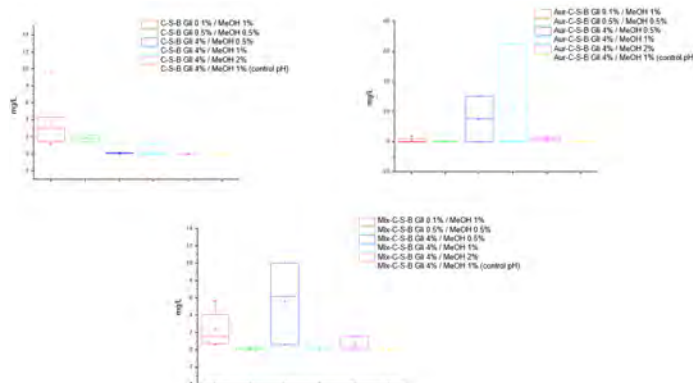


Fig. 2. Rendimientos de las proteínas CSB, Aur-CSB y Mix-CSB en diferentes condiciones de glicerol (Gli) y metanol (MeOH).

Conclusiones. En los gráficos de densidad óptica podemos observar que los valores más altos de biomasa obtienen cuando las condiciones son glicerol al 4%, metanol al 1% y el pH se mantiene en 6 para las tres proteínas. Sin embargo, los mayores rendimientos de la proteína CSB se al emplear glicerol al 0.1% y metanol al 1%. Por otra parte, los rendimientos para las proteínas Aur-CSB y Mix-CSB mejoraron al usar glicerol al 4% y metanol al 1% y 0.5%, respectivamente.

Agradecimiento.

CONACyT Frontera de la Ciencia 2019 (160671).

Bibliografía.

- Moreno-Gutierrez, D. S., Zepeda-Cervantes, J., Vaca, L., & Hernandez-Garcia, A. (2021). *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 129(112348), 112348.
- Moreno-Gutierrez, David S., Del Toro-Ríos, X., Martínez-Sulvaran, N. J., Perez-Altamirano, M. B., & Hernandez-Garcia, A. (2023). *Biomacromolecules*, 24(4), 1563–1573.
- Subramanian, S., Ross, N. W., & MacKinnon, S. L. (2009). *Marine Biotechnology (New York, N. Y.)*, 11(6), 748–757.
- Madanchi, H., Akbari, S., Shabani, A. A., Sardari, S., Farmahini Farahani, Y., Ghavami, G., & Ebrahimi Kiasari, R. (2019). *Drug Development Research*, 80(1), 162–170.

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INULINASA RECOMBINANTE DE *BACILLUS VELEZENSIS*

Edna Alejandra Ortiz Castañeda, Carmina Montiel Pacheco, Facultad de química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, CDMX 04510, carmina@unam.com.mx

Palabras clave: enzima, recombinante, caracterización

Introducción. La sacarosa y el almidón son los carbohidratos de reserva más estudiados en plantas. Sin embargo, el 15 % de plantas en su etapa de floración utiliza fructanos como alternativa¹. Estos compuestos son polímeros no estructurales de unidades de fructosa, unidas por medio de enlaces β -(2 \rightarrow 1) o β -(2 \rightarrow 6), encontrándose en el tejido vegetal de muchas plantas como pastos, forrajes y cereales. La estructura específica de los mismos depende del tipo de organismo del que provienen². La hidrólisis enzimática de estos compuestos produce oligómeros llamados fructooligosacáridos (FOS) que funcionan como prebióticos, siendo potentes estimuladores de la microbiota intestinal benéfica. Así mismo, la inulina puede ser empleada en la producción de fructosa a partir de su hidrólisis. Entre los usos más significativos de la fructosa a nivel industrial se encuentran la obtención de jarabes de alta fructosa y también se puede utilizar en la producción de etanol y bioplásticos. Las enzimas capaces de hidrolizar estos carbohidratos son las glicosilhidrolasas (GH), las cuales cortan el enlace glicosídico entre dos residuos de la cadena polimérica. Las enzimas pertenecientes a esta familia son producidas por una gran cantidad de organismos, incluyendo hongos, levaduras, plantas y bacterias. Las bacterias son un amplio género de microorganismos poco estudiados capaces de producir estas enzimas. *Bacillus velezensis* es una bacteria que ha sido aislada del bagazo de agave y caracterizada en nuestro grupo de investigación, se estudió su genoma en búsqueda de enzimas con la capacidad de hidrolizar fructanos, encontrando tres glicosilhidrolasas: una levanasa, una inulinasa y una levansacarasa.

Metodología. Se llevó a cabo la evaluación de la presencia del gen de la inulinasa recombinante en el vector de expresión pET28b(+). Posteriormente, se evaluó la viabilidad de expresión de la cepa transformada, *E. coli* BL21(DE3) utilizando IPTG como inductor y corroborando la presencia de la enzima con un gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Una vez comprobada su viabilidad, se obtuvieron las mejores condiciones de expresión para la inulinasa recombinante, variando la concentración de IPTG, temperatura y tiempo de inducción. Finalmente la enzima se purificó mediante cromatografía de afinidad.

Resultados. Se puede observar en los carriles 2 y 4 la presencia de dos fragmentos de DNA coincidentes con el tamaño esperado de los cortes realizados por las enzimas NdeI y XhoI: uno de 1470 pb, correspondiente al gen de la inulinasa y otro de 5386 pb, correspondiente al vector pET28b (+), sugiriendo que el inserto se encuentra en el plásmido recombinante y es viable realizar la expresión de la inulinasa recombinante. En los carriles 1 y 2 se muestra el plásmido sin digerir.

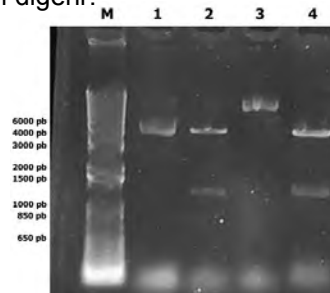


Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del DNA plasmídico puro. Marcador de DNA (M), construcción pET28b(+):Inu sin digerir (1, 3) y digestión de la construcción pET28b(+):Inu (2, 4). Las digestiones se realizaron por duplicado.

Una vez corroborado que *E. coli* BL21(DE3) contenía el plásmido con gen de la inulinasa, se llevó a cabo la inducción de la proteína utilizando IPTG a diferentes concentraciones por 24 h, a 37 °C (Fig. 2), observándose que la mejor concentración de inductor fue de 0.2 mM. El tamaño esperado del gen es de 1470 nucleótidos, por lo tanto, se espera una secuencia de 490 aminoácidos. Considerando esto, la proteína tendría un peso molecular esperado alrededor de los 54 kDa.

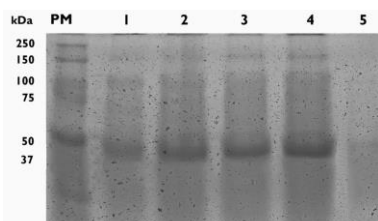


Fig. 2 Gel SDS-PAGE de la inducción del gen de la inulinasa recombinante con diferentes concentraciones de IPTG. Marcador de peso molecular (PM), inducción con 0.05 mM (1), 0.075 mM (2), 0.1 mM (3), 0.2 mM (4) y 0.4 mM (5) de IPTG.

Con la concentración del IPTG determinada, se varió el tiempo y la temperatura de inducción. Se decidió que las mejores condiciones de inducción fueran 20°C por 4 horas, aunque en todas las condiciones probadas hubo expresión de la proteína.

El resultado de la purificación se muestra en la fig. 3, en donde se observan tres picos principales con valores significativos, correspondientes a las fracciones 2, 5 y 18 y 19.

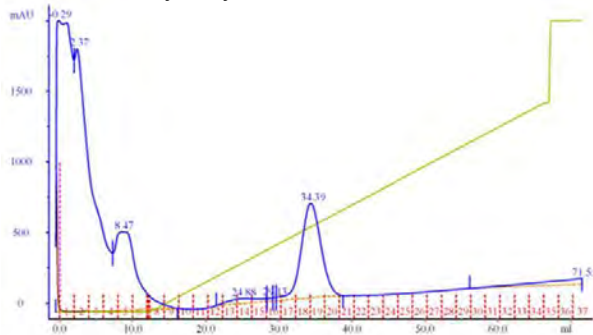


Fig. 3 Cromatograma resultante del ensayo de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) utilizando una columna de afinidad de níquel.

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE para corroborar la pureza de la inulinasa recombinante.

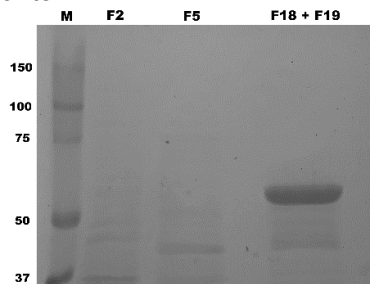


Fig. 4 Gel SDS-PAGE de la purificación de la inulinasa recombinante por FPLC, utilizando una columna de afinidad de níquel. Marcador de peso molecular (M) y fracciones con presencia de proteína obtenidas durante el proceso (F2, F5 y F18 + F19).

Como se muestra en la fig. 4, existe una alta concentración de una proteína de peso molecular mayor a 50 kDa, observada en el carril de la muestra compuesta por las fracciones 18 y 19.

Se evaluó el comportamiento enzimático de la proteína purificada a distintas condiciones de temperatura, manteniendo constante el pH (8) (condición evaluada previamente utilizando el sobrenadante celular) y sustrato utilizado (inulina de achicoria) (fig. 5), así como el comportamiento enzimático a distintas condiciones de pH, manteniendo constante la temperatura (50 °C) y sustrato utilizado (inulina de achicoria) (fig. 6).

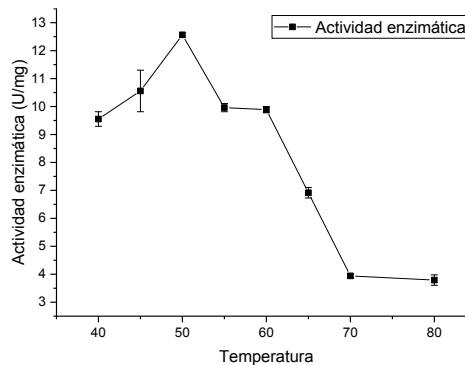


Fig. 5 Efecto de la temperatura en la actividad específica de la enzima. Las reacciones se realizaron al 1 % de sustrato (inulina de achicoria), a pH 7 y evaluadas a diferentes valores de temperatura (40-80 °C).

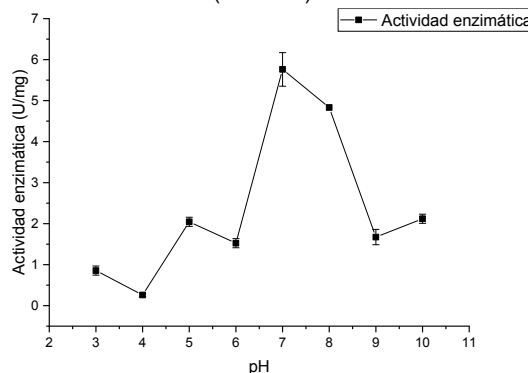


Fig. 6 Efecto del pH sobre la actividad específica de la inulinasa. Las reacciones se realizaron al 1 % de sustrato (inulina de achicoria), a 50 °C y evaluadas a diferentes valores de pH (3-10).

Conclusiones. Se evaluó la funcionalidad del gen de la inulinasa de *B. velezensis* dentro del vector de expresión pET28b(+) en *E. coli* BL21(DE3). Se definieron las mejores condiciones de tiempo, temperatura y concentración de inductor (IPTG) de la inulinasa recombinante, concluyendo que la mayor expresión se da a una temperatura de 20 °C por 4 horas y añadiendo una concentración de 0.2 mM de IPTG durante la inducción.

De igual forma, se determinaron las mejores condiciones de pH y temperatura en las cuales la proteína presentaba una mayor actividad enzimática. La reacción debe llevarse a cabo en un medio a pH 7, a 50 °C por 20 minutos.

Agradecimiento. A DGAPA UNAM por el financiamiento a través del proyecto PAPIIT IN219520. Facultad de Química PAIP 5000 9153.

Bibliografía.

1. Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabjins, A., & Van den Ende, W. (2009). *Journal of Experimental Botany*. Vol (60): 727-740.
2. Kochhar, A., Gupta, A. K., & Kaur, N. (1999). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 549-554.

A COPPER-CHELATING PEPTIDE WITH THERAPEUTIC POTENTIAL AGAINST ALZHEIMER'S DISEASE: CELLULAR AND MOLECULAR EFFECTS

Victor E. López-Guerrero^{1,2}, Yanahi Posadas^{1,2}, José Segovia¹, Liliana Quintanar²,
¹Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Cinvestav, México, 07369,
²Department of Chemistry, Cinvestav, México, 07369,
²Center for Research in aging, Cinvestav, México, 14330.
 e-mail: victor.lopez@cinvestav.mx
 Keywords: Alzheimer, Cellular Prion Protein, Copper

Introduction.

The amyloid beta peptide (Aβ) is a fragment of 40 to 42 residues that plays a key role in Alzheimer's disease (AD). This peptide aggregates generating amyloid plaques during the pathology.¹ The onset of AD is accompanied by a dysregulation in the physiological levels of copper in the central nervous system (SNC). Copper is accumulated in amyloid plaques from post-mortem brains of patients with AD.² During early stages of the disease, synapses are among the first structures to be compromised, indeed, synapse dysfunction has been associated to perturbations from synaptic calcium-handling in response to overactivation of the N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs). For instance, these receptors directly bind to, and are regulated by the cellular prion protein (PrP^C) in a copper-dependent manner. PrP^C is a brain-abundant protein that coordinates up to 6 Cu²⁺ ions: two in a region called non-octarepeat region (non-OR) and one to four copper ions in the octarepeat region (OR). Interestingly, specific Cu²⁺-chelators or Aβ peptides disrupt the Cu²⁺-mediated NMDAR-PrP^C interaction.^{3,4} Although the role of copper in AD is not fully understood, the use of chelating agents that prevent the Cu²⁺-Aβ interaction has been proposed as a therapeutic strategy, however, the mechanisms and selectivity towards Aβ have not been entirely evaluated.

Here, we study that a bifunctional non-natural tetrapeptide (TP) depletes the Aβ monomer from copper ions and modulates its aggregation.⁵ Specifically, we evaluated the ability of TP to compete for Cu²⁺ with several synaptic copper-binding proteins that are important in physiological and pathological contexts by means of spectroscopic techniques, such as the copper transporter receptor 1 (CTR1), human serum albumin (HSA) and the truncated amyloid beta 4-16 (Aβ(4-16)). Additionally, we evaluated the effect of the TP in the copper-dependent modulation of NMDAR by the PrP^C. (see fig. 1)

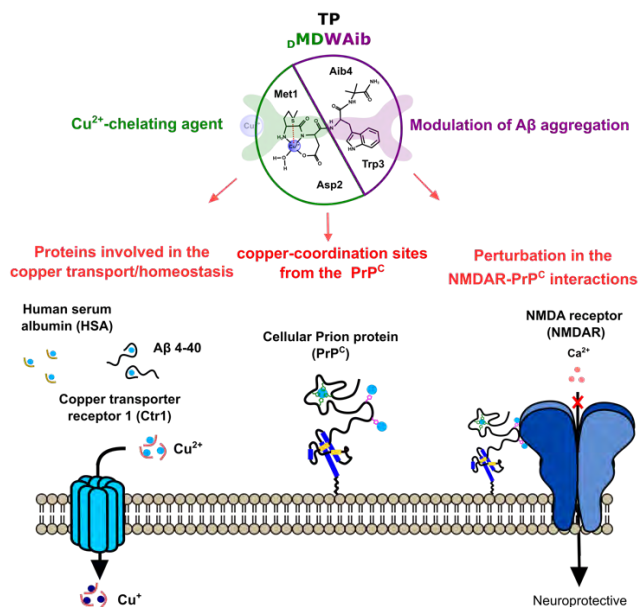


Fig. 1. Overview of the evaluation of TP in copper-dependent sites from synaptic proteins and in copper-dependent processes relevant to AD.

Methodology.

- 1- Peptide models that mimic the copper-binding sites of synaptic proteins were prepared using solid-phase synthesis and were purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS).
- 2- The competition for copper between TP and relevant synaptic proteins for the disease (CTR1, HSA, Aβ(4-16), PrP^C) was evaluated using electronic absorption in the UV-Vis region, circular dichroism (CD) and electronic paramagnetic resonance (EPR).
- 3- Functional effects of the TP were performed using neuroblastoma cell line. The copper-dependent interaction between NMDAR and PrP^C was evaluated through immunoblotting, immunocytochemistry and co-immunoprecipitation assays.

Results.

- 1- TP is a copper-selective chelator
- 2- TP does not remove copper from the proteins involved in the copper transport and homeostasis (CTR1, HSA, A β (4-16))
- 3- TP displays pleomorphic effects when is confronted with the copper-binding sites of the PrP^C: it removes copper from the non-OR sites and generates a ternary complex PrP^C-Cu²⁺-TP with the OR region.
- 4- TP does not affect the cell viability of a neuroblastoma cell line.
- 5- TP perturbs partially the copper-dependent modulation of the NMDARs by the PrP^C

Conclusions.

1. The copper-chelating effect of TP against A β peptides would not be affected by the zinc release from glutamatergic synapses to the synaptic cleft even at 10:1 Zn²⁺:Cu²⁺ ratios.
2. TP would not disrupt the Cu²⁺ homeostasis in the brain, since it does not remove Cu²⁺ from CTR1, HSA or A β (4-17). Moreover, TP could potentially shuttle-back the copper to these proteins.
3. TP generates a ternary complex with the OR region from the PrP^C. That phenomenon could impact the functional *cis* conformation of PrP^C.
4. TP removes copper from the non-OR sites from PrP^C. Any function associated with those sites would be affected by the TP-chelating properties.
5. Since TP does not affect the viability of a neuroblastoma cell line, it would not affect the copper-independent functions of neurons during the disease.
6. Removal of copper by TP could partially perturb the copper-dependent NMDAR modulation by the PrP^C.

Acknowledgements. Funding Agency National Council for humanity, Science and Technology (CONAHCYT) through PhD fellowship to VELG and postdoctoral fellowship to YP. The project is also supported by UC-Cinvestav grant.

References.

1. Kent, S., Spires-Jones, T., Durrant, C., (2020), *Acta Neuropathol.*, 140, 417-447.
2. Wang, H., Wang, M., Wang, B., Li, M., Chen, H., Yu, X., Yang, K., Chai, Z., Zhao, Y., Feng, W., (2012), *Metallomics*, 4, 1113-1118.
4. You, H., Tsutsui, S., Hameed, S., Zamponi, G., (2012), *PNAS*, 109, 1737-1742.
4. Posadas, Y., Parra-Ojeda, L., Pérez-Cruz, C., Quintanar, L., (2021), *Inorg. Chem.*, 60, 8958-8972.
5. Marquez, M., Blancas-Mejía, L., Campos, A., Rojas, L., Castañeda-Hernández, G., Quintanar, L., (2014), *Metallomics*, 6, 2189-2192.



ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA SUBUNIDAD β DE LA ATP SINTASA

Edgar López Pérez¹, Salomón J. Alas Guardado², Gerardo Pérez Hernández²

¹Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM Cuajimalpa, Ciudad de México 05300.

²Departamento de Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM Cuajimalpa, Ciudad de México 05300.
edgarlopezperez07@gmail.com

Palabras clave: ATP sintasa, estabilidad térmica dinámica molecular,

Introducción. La F_0F_1 -ATP sintasa es una enzima que se encarga de brindar energía para la mayoría de reacciones celulares, mediante la síntesis del adenosín trifosfato (ATP). Este complejo enzimático está formado por diferentes subunidades. La subunidad β catalítica es de particular interés para entender cómo se modulan los cambios conformacionales necesarios para llevar a cabo la catálisis de ATP. Se sabe que la subunidad β soluble y aislada del organismo termófilo *Bacillus PS3* ($T\beta$) mantiene su estructura tridimensional estable (1). Además, $T\beta$ exhibe cambios conformacionales similares a los observados dentro del complejo F_1 , por lo que es un buen modelo para estudiar la flexibilidad estructural de las subunidades catalíticas de la ATP sintasa (2). No obstante, el gran desafío es correlacionar la flexibilidad funcional de $T\beta$ con su estabilidad estructural. Para lograr lo anterior, en este trabajo se realizaron análisis de desplegamiento térmico seguidos por dicroísmo circular (CD) y dinámica molecular (MD). Esto permitió obtener una explicación molecular al comportamiento estructural de $T\beta$ a diferentes temperaturas.

Metodología. Con los datos de CD en función de la temperatura se realizó una deconvolución para obtener la proporción de estructura secundaria de $T\beta$. También se hizo un análisis termodinámico de 2 estados con un modelo reversible $N \rightleftharpoons U$ tomando como referencia los datos del barrido térmico a 220 nm. Además, con los datos generados por MD se obtuvieron dos parámetros estructurales de $T\beta$ a cinco temperaturas diferentes: estructura secundaria (SS) y contactos nativos (Q). Por último, se hicieron análisis de termodinámica estructural para obtener paisajes energéticos y curvas de estabilidad termodinámica.

Resultados. En este trabajo se determinó el proceso de desplegamiento térmico de $T\beta$ por dos diferentes metodologías (CD y MD). Se encontraron evidencias de que el estado desplegado no se encuentra totalmente extendido y mantiene estructura residual,

en particular, la estructura secundaria hoja β del dominio N-terminal (Figura 1).

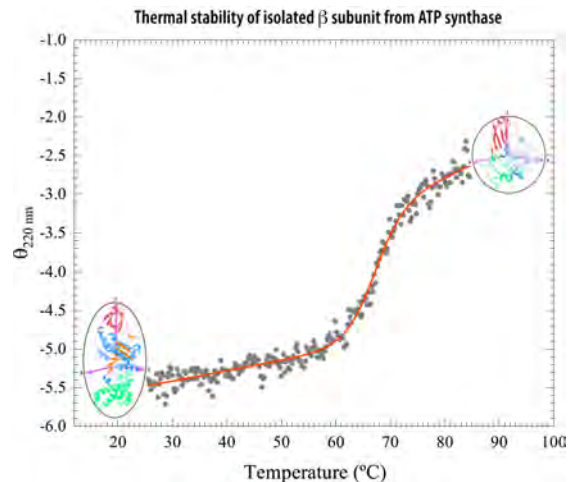


Fig. 1. Ajuste de un modelo de 2 estados a partir de CD. En el inicio y final de la curva se muestra una estructura proveniente de la MD a 300 y 500 K

Conclusiones. El desplegamiento térmico de $T\beta$ no es un proceso aleatorio y sigue un comportamiento por dominios estructurales, siendo el dominio N-terminal el más estable, seguido por el dominio central y por último el dominio C-terminal. Lo anterior se relaciona con el mecanismo funcional de la ATP sintasa, esto es, durante la catálisis el dominio N-terminal se mantiene fijo y proporciona soporte en el ensamble F_1 , mientras que el dominio central tiene afinidad por el ligando, y en combinación con el dominio C-terminal, actúa como un impulsor que desencadena los cambios conformacionales. Por otra parte, en el proceso de estabilización de $T\beta$ predomina el efecto hidrófobo que se da principalmente por las SS hoja β (3).

Agradecimiento. Se agradece al CONAHCYT por el apoyo otorgado a través del proyecto A1-S-46202 y por la beca de doctorado número 798732.

Bibliografía.

1. Harada, M., *et al.* (1991) *J Biol Chem.* 266. 11455-11460.
2. Ito, Y., Oroguichi, T., Ikeguchi, M. (2011) *J Am Chem Soc.* 133, 3372-3380.
3. López Pérez, E. *et al.* (2023) *Prot. Sci.* 32 (7), e4689 (1-17).

INGENIERÍA DE PROTEÍNAS APLICADA A LA PET HIDROLASA

Estrada Reyes Ian Giovanni¹, Dr. Marcos Viquez Jorge Angel¹, Dra. Marlet Martínez Archundia². M en C. Jesús de Magyber de Jesús Miranda³. ¹Openbiolab S. de R.L. de C.V., Ciudad de México, C.P. 04360. ²Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. ³Procesos Alimentarios, Unidad Académica de Capulhuac de la Universidad Tecnológica el Valle de Toluca. * info@openlab.com.mx.

Palabras clave: Enzimas, in silico, PETasa

Introducción. Los productos de PET se han considerado una amenaza para la salud del hombre y el medio ambiente durante muchos años debido a que su proceso de degradación es relativamente alto, ya que contaminan le agua, el aire, el suelo y el ambiente. La investigación *in silico* es una rama de la biología computacional que tiene como objetivo estudiar y experimentar con procesos biológicos utilizando simulaciones por computadora. Este nuevo enfoque digital hace posible visualizar las estructuras tridimensionales, observar los efectos y funciones de diferentes moléculas, proteínas e incluso células enteras, hasta que las respuestas a los estímulos puedan predecirse experimentalmente mediante simulaciones por computadora (1). Utilizando *Ideonella sakaiensis* como agente biodegradante del plástico de polietileno tereftalato (PET) que se ha encontrado que posee una enzima llamada PET hidrolasa (PETasa) que ayuda a la biodegradación del mismo, al realizar análisis mediante la ingeniería de proteínas para el análisis *in silico*, permitira el desarrollo de nuevas variantes de PET hidrolasas, que por ende dará una mejora en el tiempo de la catálisis. El objetivo es Diseñar 5 variantes de PET hidrolasa mediante ingeniería de proteínas para mejorar sus propiedades catalíticas en la degradación del PET mediante mutagénesis in silico por acoplamiento molecular.

Metodología. El plan del trabajo es la utilización de la ingeniería de proteínas para realizar mutagenesis *in silico* por acoplamiento molecular, partiendo de la enzima PETasa proveniente de la bacteria *Ideonella sakaiensis*, realizando la fluctuación cuadrática media de la raíz (2), docking molecular (3) y un análisis múltiple de secuencias (4) para diseñar las variantes de PET hidrolasas.

Resultados. Se realizó un RMSF, MSA, PPI y Doking molecular para proponer y diseñar mutantes de la PETasa de *Ideonella sakaiensis*, con el fin de mejorar la catálisis y su interacción entre el ligando y la enzima, de igual manera se realizó un análisis de estructura en alphafold 2, para ver el problema del plegamiento de la enzima, lo cual arrojó buenos resultados de las 5

enzimas, con niveles de pLDDT > 90, es decir, son adecuados conforme a esa medida de confianza. Estas enzimas se les nombro A65D (A), V211 (B), A65D; V211 (C), I168R (D), A65D; V211; I168R (E) y finalmente la silvestre (F).

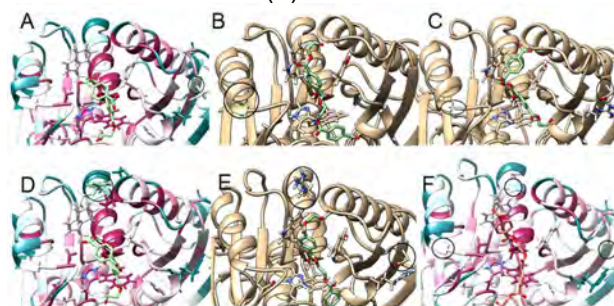


Fig. 1. Dockin molecular entre el dímero de 2PET y las nuevas enzimas; se observa lo que es la enzima silvestre con el acoplamiento molecular, en donde está encerrado en color negro los aminoácidos sin mutar que es A65, V211 e I168 (F), y de igual manera las mutantes con sus diferentes acoplamientos con el dímero de 2PET, donde se encuentra encerrado en color negro que aminoácido se mutó en cada uno de las mutantes (A-E), en donde se observa que en la delección de V211 se ve más contraída y más angosta la lámina alfa (B, C, E) a comparación que la silvestre.

Conclusiones. Los hallazgos indican y siguen que los estudios *in silico*, son ideales para realizar mutagénesis, los análisis de RMSD, RMSF, MSA, PPI, que informan sobre la posición de cada aminoácido con mayor importancia, sus regiones conservadas y no conservadas, la interacción aminoácido, aminoácido, lo que permitió identificar que aminoácidos es de gran importancia para su mutagénesis *in silico*, logrando 5 variantes que mejoran su actividad catalítica, nombradas de la siguiente manera A65D, V211, A65D:-V211, I168R y A65D:-V211:I169R.

Agradecimiento. Agradezco a Open lab por el financiamiento para presentar el cartel.

Bibliografía.

1. Vargas A, Fuentes C, (2021), *SCIELO*, pág. 1-1
2. Martínez L, (2015), *PLOS ONE*, pág. 1-1
3. Ballón W, Grados R, (2019), *CCON-CIENCIA*, pág.56-57.
4. Mohammad Y, Afshana S, Khalid Z, (2021), *Multiple sequence alignment tools – software and resources*, Mohammad Y. Academic Press; 1er, India, pág-55-73.

Rediseño de proteínas dCas12 fusionadas con la proteasa del virus grabado del tabaco para detección de ADN

Alanis-García Mario, Hernández-García Armando. Correo de contacto: armandohg@iquimica.unam.mx Departamento de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, UNAM, CdMx, CP. 04510.

Palabras clave: CRISPR diagnóstico, split protein, proteasa TEV

Introducción. La proteína asociada a CRISPR 12 (Cas12) es una endonucleasa que emplea un fragmento de un ssRNA (denominado gRNA) para identificar una determinada secuencia de dsDNA y posteriormente, cataliza un corte en ambas cadenas (actividad *cis*). Una vez realizado ambos cortes, esta enzima es capaz de hidrolizar ssDNA circundante inespecíficamente (actividad *trans*). El complejo Cas12-gRNA tiene una alta afinidad por la secuencia blanco; $K_d = 54$ fM (1) que ha permitido, junto con la actividad enzimática *trans* desarrollar biosensores para la detección de ácidos nucleicos (2) inclusive, la FDA ha autorizado su uso en la pandemia de COVID19. Sin embargo, el empleo de este sistema está limitado por las propias características de la cinética enzimática *trans*. Se ha establecido que el límite de detección para este sistema es de 100 fM a 10 pM (3). El objetivo de este trabajo es desarrollar un sistema de detección de DNA empleando la proteína Cas12a cuya actividad hidrolítica ha sido suprimida (dCas12) y acoplarlo a un sistema autocatalítico de proteínas divididas (*split proteins*) para amplificar la señal primaria en un tipo de cascada de señalización, con el objetivo de incrementar el límite de detección (LoD). dCas12 se fusiona con la proteasa TEV vía el complejo de dimerización FRB-FKBP en presencia de rapamicina. Se emplea una versión dividida de la proteasa TEV que podrá reconstituirse solo cuando TEV (que se encuentra fusionada a dCas12a) se encuentre presente.

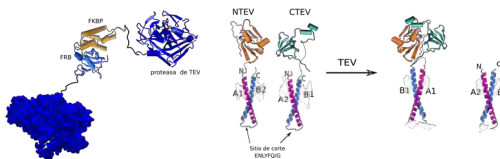


Fig. 1. (izquierda) dCas12a-Proteasa TEV fusionada vía FRB-FKBP. (derecha) Reconstitución de la proteasa TEV dividida.

Metodología.

Los amplicones de las construcciones NTEV y CTEV fueron previamente ligados por medio de

una ligación independiente de ligasa (LIC) mientras que FKBP-TEV fueron doblemente digeridos con *Sall* y *SpeI* y, posteriormente, ligados empleando la T4 DNA ligasa. Todas las construcciones fueron optimizadas para *E. coli*. Las proteínas están siendo purificadas por medio de cromatografía de afinidad (Niquel), de intercambio iónico y exclusión molecular.

Resultados.

Los componentes proteicos (CTEV, NTEV, FKBP-proteasa TEV) han sido clonados en *E. coli* DH5 α (ver Fig. 2).

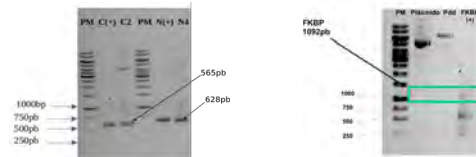


Fig. 2. (Izquierda) Gel de agarosa al 1% de una PCR de plásmido con los insertos de los amplicones de NTEV (N) y CTEV (C). (Dercha) Plásmido: plásmido extraído con el amplicón FKBP-proteasa TEV previamente ligado. Pdd: plásmido doblemente digerido. FKBP (+): amplicón de FKBP-Proteasa TEV. PM: GeneRuler 1kb DNA Ladder.

Las proteínas han sido sobre expresadas en *E. coli* BL21(DE3) y sobre expresadas con IPTG 1mM (ver Fig. 3).

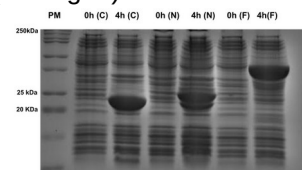


Fig. 3. Gel SDS PAGE al 15% con los lisados a 0h y 4 h después de agregar IPTG 1 mM. C: CTEV (23 kDa), N: NTEV (25 kDa) y F: FKBP-proteasa TEV (40 kDa). PM: Kaleidoscope.

Conclusiones.

Los componentes proteicos necesarios para el funcionamiento del sistema han sido clonados y sobre expresados exitosamente en *E. coli*.

Agradecimiento. Agradezco al CONACHYT (957207).

Bibliografía.

1. Strohkendl, I, Saifuddin, F., Rybaski, J., Finkelstein, I., & Russell, R. (2018) *Mol. Cell.* 71, 816–824.

2. Hernández-García, A., Morales-Moreno, M., Valdéz-Galindo, G., Jiménez-Nieto, E. & Quezada A. (2022) *Diagnostics*, 12 (6) 1434.
3. Ramachandran A. & Santiago, J. (2021) *Anal. Chem.* 93, 7456–7464.

MODELADO COMPUTACIONAL PARA EL REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS COMO POTENCIALES INHIBIDORES PARA LA DIANA CTSK

Jimena Berenice Valdez Cabral, Ma. Del Refugio Cuevas Flores, Luis Córdova Bahena,
Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Zacatecas, Zac.
C.P.98160, jimenaabvc@gmail.com

Palabras clave: CTSK, metástasis, reposicionamiento de fármacos.

Introducción. La cathepsina K, también conocida como CTSK, es un tipo de cisteína proteasa lisosomal que desempeña un papel crucial dentro de ciertas rutas metabólicas y procesos celulares relacionados con el desarrollo metastásico de distintos tipos de cáncer; destacando su actividad degradativa de la matriz extracelular y su participación en distintas rutas de señalización (1). Estos hallazgos destacan su relevancia en la investigación clínica del cáncer y resaltan la importancia de buscar inhibidores específicos de esta proteína, convirtiéndola en una potencial diana terapéutica (2). Para agilizar este proceso, a la par que se reducen costos, tiempos y riesgos, es posible utilizar como herramienta el reposicionamiento de fármacos (3).

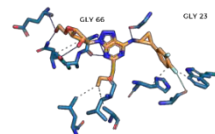
El objetivo principal de este trabajo es la selección de potenciales inhibidores de esta diana a partir del reposicionamiento de fármacos presentes en distintas bases de datos, utilizando sistemas computacionales.

Metodología. Se seleccionaron estructuras cristalográficas de la base de datos PDB (Protein Data Bank) que contuvieran la interacción entre la diana terapéutica y diferentes inhibidores. Con estos datos, se diseñó un modelo de farmacóforo en Pharmit, considerando propiedades relevantes para la formación de interacciones. Los inhibidores se eligieron de las bases de datos FDA y ChEMBL drugs approved fixed, con el objetivo de reposicionar fármacos existentes. Mediante el acoplamiento *in silico* en Molegro Virtual Docker, se evaluó la eficiencia de los inhibidores como ligandos mediante análisis energético.

Resultados. Se seleccionaron seis potenciales inhibidores a partir de fármacos ya aprobados, Nebivolol, Ticagrelor, Fostamatinib, Riboflavina, Silibinina y el compuesto con el código ChEMBL1989141.

Tras el acoplamiento, todos los inhibidores seleccionados mostraron interacciones en los residuos característicos para el sitio de acción de la diana terapéutica, mostrando como ejemplo el inhibidor Ticagrelor en la figura 1.

Fig. 1. Interacciones obtenidas por el acoplamiento del potencial inhibidor Ticagrelor.



Además, como se muestra en la Tabla 1, fue posible obtener un perfil energético para cada inhibidor, datos que fueron ordenados de acuerdo a la eficiencia de ligando (EL).

Tabla 1. Comparaciones energéticas de los inhibidores seleccionados, bajo los parámetros de cambio de energía libre y eficiencia del ligando.

| Inhibidor | ΔG^* (kcal/mol) | #átomos pesados | EL (kcal/mol*átomos pesados) |
|---------------------|-------------------------|-----------------|------------------------------|
| Ticagrelor | -155.6 | 36 | -4.3 |
| ChEMBL1989141 | -146.5 | 38 | -3.9 |
| Fostamatinib | -119.3 | 40 | -3 |
| Silibinina | -115.3 | 35 | -3.3 |
| Nebivolol | -111.7 | 29 | -3.9 |
| Riboflavina Fosfato | -98 | 31 | -3.2 |

Conclusiones. Los inhibidores seleccionados, entre los cuales destacan Ticagrelor, ChEMBL1989141 y Fostamatinib, demuestran un gran potencial para su reposicionamiento como fármacos, al mostrar interacciones que favorecen su eficiencia de ligando, como se ha demostrado tras el acoplamiento y posterior análisis energético. Lo previamente mencionado resulta prometedor y abre la perspectiva en el enfoque terapéutico de la diana CTSK.

Agradecimientos. Universidad Autónoma de Zacatecas.

Bibliografía.

1. Qian, D., He, L., Zhang, Q., Li, W., Tang, D., Wu, C., Yang, F., Li, K. & Zhang, H. (2022) *Curr Oncol.* 29(8): 5963-5987.
2. Verbovšek, U., Van Noorden, C. J., & Lah, T. T. (2015) *Semin Cancer Biol.* 35: 71-84
3. Zamami, Y., Hamano, H., Niumura, T., Aizawa, F., Yagi, K., Goda, M., Izawa-Ishizawa Y. & Ishizawa, K. (2021). *Front. Pharmacol.* 12: 752174

PROPUESTA DE REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS Y NUEVAS OPCIONES PARA EL OBJETIVO TERAPEUTICO ALK QUINASA POR MEDIO DE TÉCNICAS DE MODELADO COMPUTACIONAL.

Eduardo Alejandro Orozco Flores, Luis Córdova Bahena, Ma. Del Refugio Cuevas Flores, Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Zacatecas, Zac. C.P.98160, lalo.orozco.flores@gmail.com

Palabras clave: Quinasa, tirosina, acoplamiento, receptor, cáncer, linfoma.

Introducción. La quinasa de tirosina ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), también conocida como receptor tirosina quinasa ALK o CD246, es una enzima que en los seres humanos está codificada por el gen ALK. Estas proteínas son consideradas de importancia como blanco terapéutico, ya que participan en el efecto de varias enfermedades como el cáncer de pulmón, el linfoma de células T maduras y el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Metodología. Mediante el uso de diversos software de análisis y modelado se recreó un modelo de farmacóforo, analizando las interacciones más importantes de inhibidores de ALK con la proteína.

El modelo a su vez fue insertado y comparado en múltiples bases de datos aprobadas para la investigación científica. El resultado de la búsqueda fueron varios fármacos de prueba, que fueron la base para ciertas pruebas de afinidad y comportamiento para determinar su potencial como fármaco.

Resultados. A partir de los 5 fármacos de prueba se usa un software de modelado para protonar cada molécula a un pH de 6.9, que es el pH al que nos interesa llegar para poder llegar hasta nuestra diana terapéutica.

Los resultados de esta protonación nos dan una distribución de micro-especies que nos permite elegir la más prevalente para formular el anclaje molecular y poder analizar los perfiles energéticos de cada fármaco de prueba con la proteína objetivo

Figura 1. Modelado de cada fármaco anclado en proteína ALK.



Tabla 1. Análisis fisicoquímico de cada fármaco en contacto con la proteína ALK.

| Fármaco | No. De Átomos | No. De Átomos pesados | Peso mol. | Energía | Enlaces flex. |
|-----------------|---------------|-----------------------|-----------|----------|---------------|
| Bortezomib | 53 | 28 | 384.237 | 156.931 | 9 |
| Dexrazoxano | 35 | 19 | 268.269 | -84.2205 | 3 |
| Furylacyr... | 43 | 22 | 307.345 | 1047.75 | 8 |
| N-[1-(3-hydr... | 44 | 21 | 289.73 | -75.1518 | 3 |
| Raltegravir | 53 | 32 | 444.416 | -104.016 | 6 |

Figura 2. Evaluación de parámetros ADME, para la viabilidad de fármacos por vía oral.



Conclusiones. Al analizar los resultados de todas las pruebas y filtros, llegamos a la conclusión que tres de los fármacos de prueba cumplen con todos los requisitos del estudio. Proponemos a el Dexrazoxano, al N-[1-(3-hydroxy-1-adamantyl)ethyl]-1H-imidazole-2-carboxamida, al Raltegravir como potenciales fármacos para ofrecer una alternativa para abordar este objetivo terapéutico.

Agradecimientos. Universidad Autónoma de Zacatecas.

Bibliografía.

- Lee, S., & Shanti, A. (2021). Effect of Exogenous pH on Cell Growth of Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9910.
- Lovly, C. M., Heuckmann, J. M., De Stanchina, E., Chen, H., Thomas, R. K., Liang, C., & Pao, W. (2011). Insights into ALK-Driven Cancers Revealed through Development of Novel ALK Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Research*, 71(14), 4920–4931.
- Holla, V., Elamin, Y., Bailey, A. M., Johnson, A., Litztenburger, B. (2017). ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*, 3(1), a001115.

In silico design and recombinant production of a peptide with antinociceptive potential inspired by a toxin from the *Centruroides elegans scorpion*.

¹Pavel Andréi Montero-Domínguez, ¹Gerardo Corzo, ¹Restano Cassulini, ²Francisco Mercado
¹Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca.
²Laboratorio de Fisiología Celular, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñoz, Ciudad de México.
E-mail: pavel.montero@ibt.unam.mx; corzo@ibt.unam.mx

Key words: *In silico methods, structural Biology, heterologous expression, antinociceptive peptides.*

Introduction. The malfunction of voltage gated ion channels (Nav's) are related to the development of pathologies related to pain perception (nociception). The β -neurotoxins obtained from scorpion venoms are peptides with the ability to alter the voltage gating kinetic of Nav's [1]. Cell8 is the only β -toxin reported to interact with the isoform Nav1.7, which is related to nociception [2]. In this study we used the sequence information of the Cell8 toxin, combined with computational methods of structural biology to design peptide variants of the β -neurotoxin rCsslI-T64R/N66R [3]. The latter with the objective to generate a peptide with antinociceptive activity.

Methodology. We used homology modelling and molecular dynamics simulation to generate an interaction model of β -neurotoxin rCsslI-T64R/N66R with the site IV of hNav1.6 [4]. This molecular model was used to infer key residues, at primary sequence level, of toxin Cell8. This information allowed us generate peptide variants of rCsslI-T64R/N66R using quick-change mutagenesis method and heterologous expression in *E. coli* strain. The peptide variants were purified with niquel chromatography and rHPLC using a C18 column [3]. The purified peptides were tested through electrophysiological and mechanonociception assay.

Resultados.

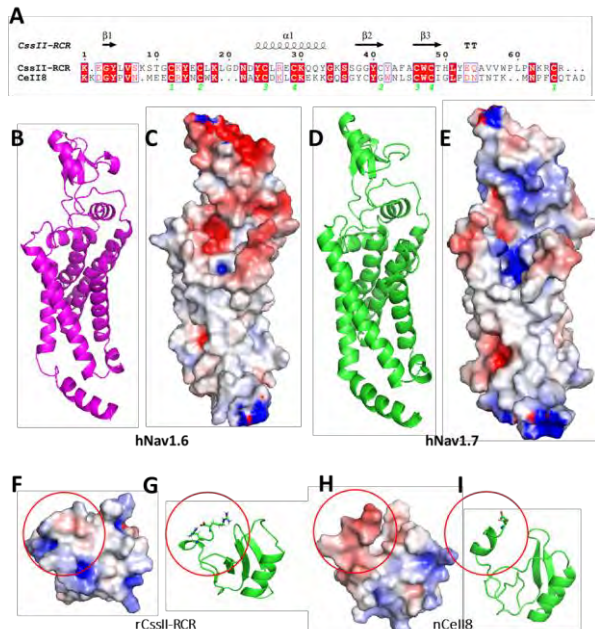


Fig 1. Sequence alignment and electrostatic potential maps for toxins and site 4 of hNav's models.

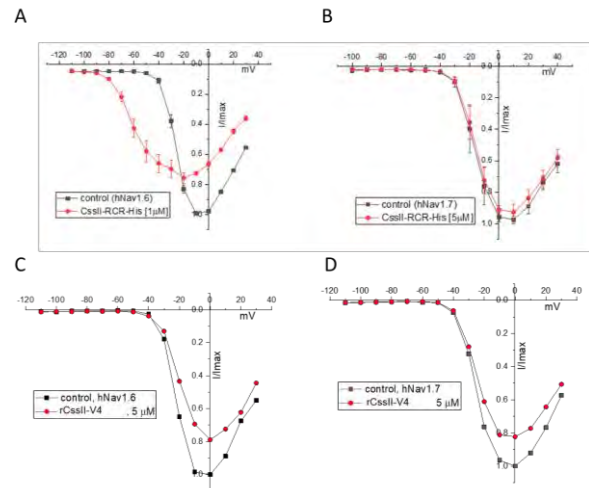


Fig 2. Electrophysiology assays for rCsslI peptide variants.

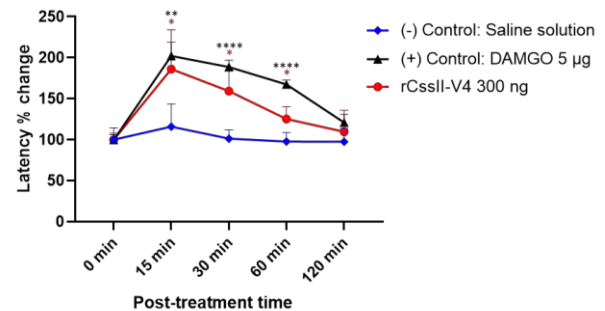


Fig 3. Mechanonociception assays of rCsslI-V4 peptide variant in CD1 mice. Data are presented as mean \pm S.D, *P < 0.05; **P < 0.01; ****P < 0.0001.

Conclusions. Although the rCsslI-V4 variant presented β -effects on the hNav1.6 and hNav1.7 channels, the latter did not show activity to move the activation potentials (lethal activity) in any of the isoforms studied. The rCsslI-V4 variant presented antinociceptive activity with respect to the control during the first hour post-treatment. The rCsslI-V4 variant presented antinociceptive activity comparable to the control (+) DAMGO in the first 15 and 30 min.

Acknowledgments. This work was funded by grants from DGAPA-UNAM grant number PAPIIT-IT200321, CONACyT-303045, CONACyT scholarship (CVU: 775900) and LANCAD-UNAM-DGTIC-376.

References.

- 1.- Rodriguez de la Vega & Possani. 2005. *Toxicon*, 46(8), 831–844
- 2.- Vandendriessche et al. 2010. *Toxicon*, 15;56(4):613-23
- 3.- Estrada et al. 2011. *Peptides*. 2011;32: 75–79.
- 4.- Montero and Corzo. 2023. *J Biomol Struct Dyn*. 22;1-9.

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE UNA NEUROTOXINA CONSENSO PROVENIENTE DE VENENOS DE ELÁPIDOS

Kenia García, Víctor Carpanta, Herlinda Clement, Ligia Corrales, Gerardo Corzo

Facultad de Ciencias Biológicas UAEM, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca Morelos,
C.P 62210, gerardo.corzo@ibt.unam.mx

Palabras clave: *E. coli*, neurotoxinas, consenso

Introducción. Dentro de la familia de las proteínas de tres dedos (3FTxs) se encuentran toxinas altamente neurotóxicas como las denominadas neurotoxinas de cadena larga (α -LNTX), las cuales se encuentran presentes en el veneno de ciertos elápidos de importancia médica. Las α -LNTXs son altamente afines a los receptores de acetilcolina neuronales y musculares (nAChR), los cuales se encuentran en baja proporción dentro del veneno y presentan variación intraespecífica. Esto último repercute en un bajo reconocimiento en la potencia neutralizante de muchos antivenenos contra la mordedura de estos elápidos, lo cual nos llevó a proponer el diseño de una proteína α -LNTX consenso. Esta neurotoxina, creada de novo, fue expresada de manera recombinante en el sistema de *E. coli* con la finalidad de ser utilizada como inmunógeno para producir anticuerpos que logren reconocer y neutralizar diferentes α -LNTX y a los propios venenos donde se encuentran.

Metodología. La secuencia codificante de la α -LcNTX fue clonada en el plásmido de expresión pQE30, posteriormente fue transformada y expresada en 3 cepas de *E. coli*, Shuffle, M-15 y Origami. Los perfiles de expresión proteica se analizaron por medio de geles de proteínas SDS-PAGE al 15% SDS-Tris-HCL, tanto para la fracción soluble citoplasmática como para la proteína insoluble (cuerpos de inclusión). Consecutivamente, solo la proteína contenida en los cuerpos de inclusión se purificaron por columna de afinidad de Ni-agarosa. Las eluciones colectadas fueron analizadas mediante RP-HPLC con una columna C18. Finalmente, las fracciones cromatográficas definidas como mayoritarias se analizaron por espectrometría de masas.

Resultados. El análisis por medio de geles SDS-PAGE de proteínas de la expresión de la α -LcNTX, se muestra en la figura 1. En dicha ilustración se observa la expresión mayoritaria de la α -LcNTX consenso en cuerpos de inclusión. Los perfiles cromatográficos obtenidos de la α -LcNTX oxidada y reducida se muestran en la figura 2. Las masas moleculares determinadas fueron de 9,015.5 Da (oxidada) y de

9 008.1 Da (reducida), por último el rendimiento por litro registrado fue de 2.4 g/L.

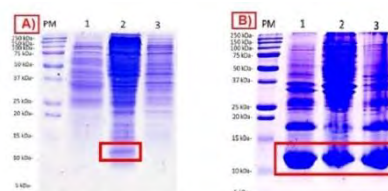


Fig. 1. A) SDS-PAGE (15% SDS) derivado de la fracción soluble de las cepas de *E. coli* 1: Origami, 2: Shuffle, 3: M-15 expresadas con el plásmido pQE30- α -LcNTX; B) SDS-PAGE (15% SDS) derivado de la fracción insoluble de las cepas de *E. coli* 1: Origami, 2: Shuffle, 3: M-15 expresadas con el plásmido pQE30- α -LcNTX. PM: marcadores de peso molecular.

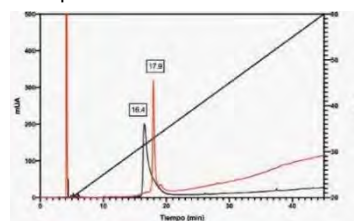


Fig. 2. RP-HPLC en fase reversa de las eluciones de Ni-agarosa: reducida (rojo) oxidada (negro). Usando un gradiente de 20-60% acetonitrilo/TFA en 40 min (solución A: agua/TA y solución B: acetonitrilo/TFA), flujo de 1ml/min.

Conclusiones. La α -LcNTX consenso se expresa en su totalidad en cuerpos de inclusión. Las masas moleculares reducida de 9,015.5 Da y oxidada de 9,008.1 Da corresponden a las masas moleculares esperadas.

Agradecimiento. Dirección General de Asuntos del Personal Académico PAPIIT - IT200321

Bibliografía.

1. De la Rosa, G. (2018) Synthesis of alpha neurotoxins as universal antigens against elapid bites.
2. De la Rosa, G., *et al.* (2019). Immunization of horses with consensus short-chain α -neurotoxin generates antibodies against a broad spectrum of venomous elapid species.
3. Nirthanan S. (2020). Snake three-finger α -neurotoxins and nicotinic acetylcholine receptors: molecules, mechanisms, and medicine.

Expresión heteróloga de variante de una neurotoxina consenso de elápidos y su capacidad inmunológica

Víctor Carpanta, Herlinda Clement, Iván Arenas, Ligia Luz Corrales-García, Gerardo Corzo, UNAM, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, 62210, gerardo.corzo@ibt.unam.mx.

Palabras clave: α -LcNTX, anticuerpos, elápidos

Introducción. Las neurotoxinas de elápidos de cadena larga (α -LNTX) son proteínas altamente neurotóxicas, las cuales se presentan en venenos de elápidos de importancia médica como son las mambas, cobras y kraits, las cuales presentan variación intraespecífica dentro de dichos venenos y aunado a su bajo porcentaje de inmunogenicidad propicia que se generen pocos anticuerpos. Esto repercute en una baja potencia de neutralización de los anti-venenos comerciales correspondientes. Considerando este problema, nuestro trabajo aborda la síntesis recombinante de una α -LNTX consenso acídica, con el fin de utilizarla como antígeno y favorecer la generación de anticuerpos de reconozcan y neutralicen a diferentes α -LNTXs de venenos de elápidos de diferentes regiones geográficas.

Metodología. La secuencia codificante de la α -LcNTX se clonó en el plásmido pQE-30 para posteriormente ser expresada en la cepa de *E. coli* M15. La fracción soluble se purificó por columna de afinidad a Níquel. Las eluciones recolectadas se sometieron a un segundo paso de purificación por RP-HPLC con columna analítica C18. La fracción cromatográfica mayoritaria de dicha purificación se utilizó para inocular conejos en dosis crecientes para la producción de anticuerpos durante 4 meses. Los anticuerpos policlonales obtenidos fueron analizados mediante ensayos de ELISA para medir el reconocimiento de las α -LNTXs y de venenos de elápidos de importancia médica.

Resultados. La α -LcNTX variante acídica se expresó de manera soluble en el citoplasma de la cepa *E. coli* M15. El rendimiento por litro de la fracción cromatográfica mayoritaria fue de 1 mg/L. Los títulos obtenidos de las sangrías durante el periodo de inmunización de conejos se muestran en la figura 1. Los resultados del reconocimiento a una α -LcNT, denominada bungarotoxina, y a venenos de elápidos de importancia médica se muestra en la figura 2.

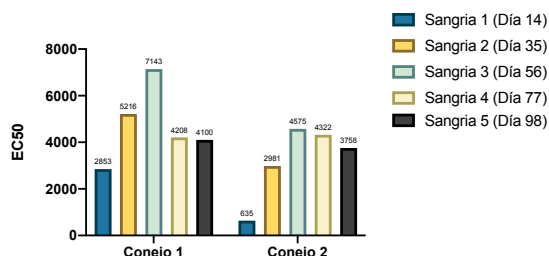


Fig. 1. Títulos obtenidos durante el proceso de inmunización en conejos utilizando como inmunógeno a la α -LcNTX variante acídica.

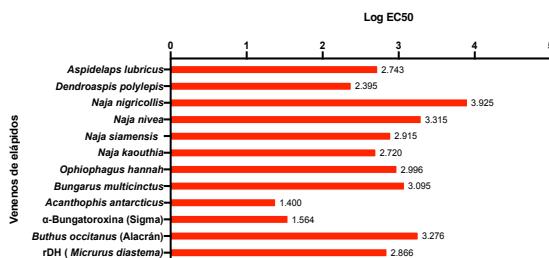


Fig. 2. Títulos de reconocimiento de los anticuerpos policlonales a α -bungarotoxina y a venenos de elápidos de importancia médica.

Conclusiones. Los anticuerpos producidos reconocen a las α -LNTX nativas y a venenos de elápidos de importancia médica de tres continentes, sin embargo, aún nos resta por determinar su capacidad neutralizante.

Agradecimiento.

Dirección General de Asuntos del Personal Académico PAPIIT - IT200321, y CONACyT- 303045 y para la beca de Doctorado 2020-000013-01NACF-11148

Bibliografía.

- De la Rosa, G., Olvera, F., Archundia, I. G., Lomonte, B., Alagón, A., & Corzo, G. (2019). Horse immunization with short-chain consensus α -neurotoxin generates antibodies against broad spectrum of elapid venomous species. *Nature communications*, 10(1), 1-8. 17.
- Gutiérrez, J. M. (2018). Antivenoms: Life-saving drugs for envenomings by animal bites and stings. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 150, 11. 36.
- Nirthanan, S., & Gwee, M. C. (2004). Three-finger α -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *Journal of pharmacological sciences*, 94(1), 1-17.

UNA NUEVA PERSPECTIVA DE LOS MECANISMOS DE EVOLUCIÓN DE PROTEÍNAS POR SELECCIÓN NATURAL Y DERIVA GÉNICA

Erandi A. Salas-Romero, Adriana Julián-Sánchez, Javier Carrillo-Campos, Danny G. Madrigal-Ceballos, José Alfredo Hernández-Zuñiga, y Héctor Riveros-Rosas; Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510; hriveros@unam.mx.

Palabras clave: evolución, enzimas, genes

Introducción. En los últimos cuarenta años, el paradigma “un gen, una enzima” propuesto originalmente por *Beadle y Tatum* (1), y luego complementado con los hallazgos de *Anfinsen* de “un gen, una estructura, una enzima”, ahora puede ser cambiado por un nuevo paradigma “un gen, varias isoproteínas/isoenzimas”, asumiendo que no sólo se pueden generar diferentes transcritos alternativos a partir de un gen, sino que también cada isoforma alternativa de una proteína puede exhibir varias conformaciones en equilibrio con el potencial de desarrollar diferentes funciones.

A partir del nuevo paradigma, podemos profundizar en las dos propiedades esenciales de las proteínas: la flexibilidad (que otorga la capacidad a las proteínas de adoptar diferentes conformaciones) y la multifuncionalidad (desarrollada a partir de los diferentes conformeros en equilibrio); estas propiedades permiten que la selección natural actúe a nivel de las proteínas, ya que la modificación en la secuencia de los genes puede alterar el equilibrio entre los diferentes conformeros, y favorecer la prevalencia de aquellos conformeros con funciones que confieren una ventaja adaptativa para las especies; de esta manera, entre los diferentes mecanismos de evolución de los genes, la duplicación/divergencia en realidad, parece ser el más importante porque permite la conservación del gen original (y su(s) función(es)), pero al mismo tiempo permite la selección de funciones secundarias preexistentes que proporcionen una ventaja selectiva al organismo.

Esta revisión sistemática pretende describir los avances más destacados en las propiedades enzimas/proteínas que nos permiten integrar una visión completa para comprender cómo actúa la selección natural y la deriva génica a nivel proteína/enzima.

Metodología. El trabajo se dividió en dos partes: 1) se realizó una búsqueda exhaustiva en las bases de datos de las publicaciones relativas a la estructura, función y evolución de proteínas, y 2) se analizó la diversidad y función de una familia de proteínas (aldehído deshidrogenasas) en bacterias (*Pseudomonas*) como paradigma para estudiar posibles mecanismos de evolución.

Resultados y conclusiones. La duplicación/divergencia es uno de los principales mecanismos de evolución de proteínas porque permite conservar la función original al mismo tiempo que la selección natural optimiza una función/actividad preexistente. La Fig. 1 muestra un ejemplo en donde 2 proteínas 99% idénticas y catalíticamente similares, participan en dos vías metabólicas distintas. Sin embargo, es importante señalar que otros mecanismos de evolución de proteínas operan de manera paralela como, por ejemplo: la transferencia horizontal, y la síntesis de genes *de novo*.

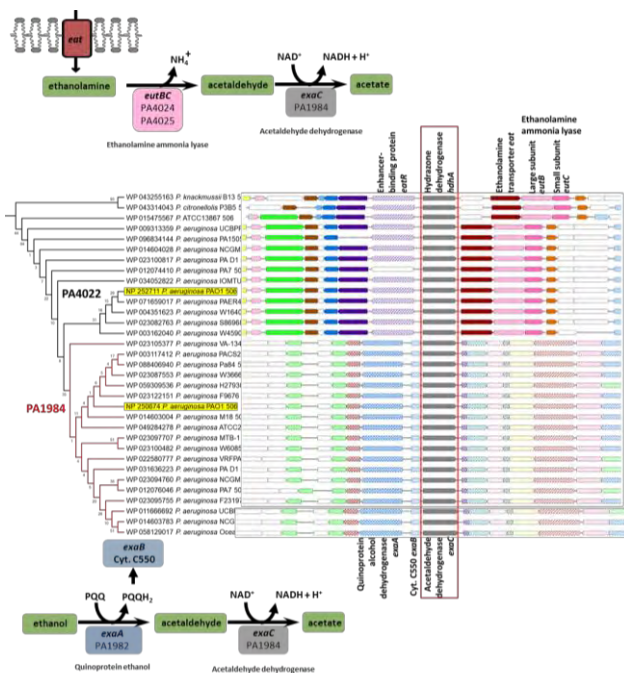


Fig. 1. PA1984 y PA4022 son dos ALDH casi idénticas (99%), sin embargo, a pesar de sus propiedades cinéticas muy similares, cada uno juega un papel metabólico diferente: PA1984 participa principalmente en la oxidación de etanol y PA4022 en el catabolismo de la hidrazona y la etanolamina.

Agradecimiento. Se agradece el apoyo del Programa UNAM-PAPIIT IN219022 y del Programa de becas Posdoctorales en la UNAM (JCC). EASR está inscrita en el programa PECEM de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Bibliografía

1. Beadle, G. W., & Tatum, E. L. (1941). *Proc Natl Acad Sci (USA)* 27(11), 499–506.

STRUCTURAL ANALYSIS OF THE CD63-SYNTENIN-1-ALIX COMPLEX FOR POST-ENDOCYTOTIC TRAFFICKING OF HPV: A DYNAMIC SIMULATION AND MOLECULAR DOCKING. Daphnne-Garcia¹, Lilian-Araujo², Abraham Pedroza³, and Sarita Montaña¹.

¹ Laboratorio de Bioinformática y Simulación Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. ² Laboratorio de biomedicina molecular, Universidad Autónoma de Guerrero. ³ Instituto Nacional de Cancerología, INCAN Ciudad de México. daphnne.garcia.fcqb@uas.edu.mx

Introduction: The CD63-Syntenin-1-ALIX complex plays a regulatory role in the trafficking process of Human Papillomavirus (HPV) after its internalization into the cell. Once HPV enters the cell, this complex is involved in regulating the virus trafficking towards the multivesicular endosomes (MVE). This is an essential process that enables the disassembly of the viral protein coat, facilitating the transport of the viral genetic material contained in the L2/DNA complex to the Golgi compartment, thereby allowing subsequent infection. HPV is a sexually transmitted viral infection and the primary etiological agent of cervical cancer. This type of cancer is one of the leading causes of death among women and the fourth most common malignant neoplasm worldwide, with approximately 528,000 new cases reported annually, resulting in a 50% mortality rate. CD63 is a transmembrane protein found in cervical epithelial cells and plays a crucial role in interacting with the virus. It participates in the formation of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs) on the cell membrane, regulating cellular functions such as endocytosis and migration. In the context of HPV infection, CD63 and the Syntenin-1-ALIX heterodimer interact with viral structural proteins, including L1 and L2. L1 is responsible for the formation of the viral capsid, while L2 facilitates the entry of the virus into host cells. It is currently proposed that CD63 acts as a cofactor for HPV, promoting the internalization of the virus through endocytosis and participating in the dispersion of HPV through extracellular vesicles. Our **objective** was to analyze, through an in-silico approach, the binding of tetraspanin CD63 with the Alix-Syntenin-1 heterodimer. **Results:** we predicted and identified specific amino acids that are involved in the binding of this protein complex. **Conclusion:** we predict the recognition of protein L1 and the CD63-Syntenin-1-ALIX complex and propose a model of the initiation of post-endocytic trafficking of HPV.

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS POR MEDIO DE SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR

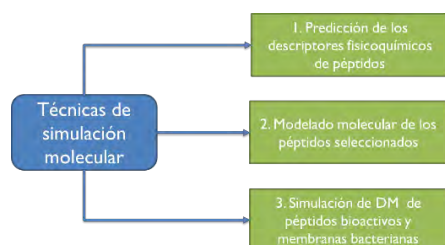
Juan Pablo Martínez Sáenz^{1,2}; Abraham Vidal Limón¹; María Juana Jiménez Vargas³.

¹INECOL A.C. Red de Estudios Moleculares Avanzados. Xalapa, CP 91073, Mexico; ²Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. Xalapa, CP 91000, Mexico. Investigador por México, CONAHCYT, adscrita a la Facultad de Ciencias Química de la Universidad de Colima. Colima, CP 28040, Mexico. zS19029613@estudiantes.uv.mx

Palabras clave: Dinámica molecular; Péptidos antimicrobianos; Membrana celular

Introducción. El incremento de la resistencia bacteriana a varios de los antibióticos actuales representa un riesgo para la salud humana a nivel mundial, no solo por el incremento de la mortalidad y morbilidad en la población, sino por daños que genera en la economía de los países (Ventola, 2015). La adquisición de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha sido más rápida que el desarrollo de compuestos para combatirlos, tanto en el sector salud como agroalimentario (Miller et al. 2022), donde los compuestos activos más usados son los antibióticos. En este trabajo evaluamos diferentes péptidos antimicrobianos (AMP) como estrategia para combatir bacterias resistentes. Nuestro objetivo es conocer el mecanismo de internalización de péptidos antimicrobianos en modelos de membranas celulares Gram(+) y Gram(-) y proponer elementos de diseño molecular basado en interacciones intermoleculares mediante herramientas de dinámica molecular (MD).

Metodología. El siguiente esquema describe de manera general estrategia metodológica.



Resultados. 1. Cálculo de las propiedades físicoquímicas de los péptidos antimicrobianos. Se calcularon 11 descriptores para los AMPs, los cuales describen propiedades físicoquímicas similares a péptidos penetradores de membranas (Fig 1).

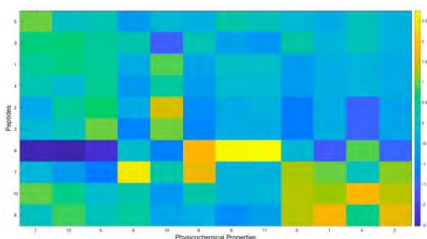


Fig. 1. Mapa de calor de descriptores moleculares calculados para AMPs.

2. Modelado de AMPs y simulaciones por dinámica molecular (MD) de los péptidos y modelos de membranas Gram(+) y Gram(-). Se calcularon las coordenadas de los AMPs mediante herramientas de predicción de estructura terciaria basado en aprendizaje profundo (AlphaFold 2).

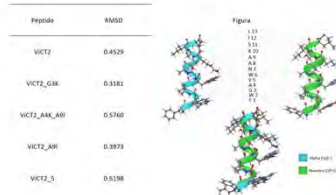


Fig. 2. Modelos 3D de los AMPs. Las estructuras fueron calculadas con AlphaFold2 para todas las secuencias de AMPs.

Se contruyeron sistemas de simulación basados en espacios ortorómbicos solvatados con moléculas de agua tipo TIP3P y sistemas membranas de 20 x 20 Å, las cuales incluyeron lípidos diferenciales para cada tipo de membrana. Con uso de los campos de fuerza ff14SB y lipid21, se simuló 250 ns de dinámica molecular convencional para todos los AMPs con el uso de pmemd.cuda incluido en Amber22. Los análisis de la internalización de los péptidos se realizó con la herramienta MEMBPLUGIN para VMD 9.3, la cual proyectó el grosor de las membranas en un mapa de calor (Fig.3)

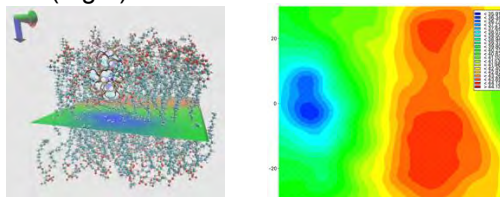


Fig. 3. Análisis de internalización de AMPs en modelos de membranas celulares bacterianas.

Conclusiones. Las herramientas de MD permiten describir las interacciones intermoleculares necesarias para describir la internalización de péptidos en membranas celulares.

Agradecimiento. Los autores de este trabajo agradecen la beca otorgada por la REFEP para la presentación de este trabajo. **Bibliografía.** 1. Ventola, C.L. (2015). P&T. Vol (40): 277-83 2. Miller, S. A., Ferreira, J. P., & Lejeune, J. T. (2022). Agric. (Switz.). Vol (12).

COMPUESTOS QUORUM SENSING DE RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS COMO MIMÉTICOS DE JASMONATOS EN PLANTAS. UNA APROXIMACIÓN *IN VITRO* E *IN SILICO*

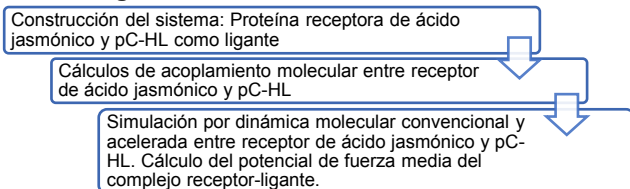
Ninfa Jiménez Acosta^{1,2}; Abraham Vidal Limón¹; Randy Ortiz Castro¹.

¹INECOL A.C. Red de Estudios Moleculares Avanzados. Xalapa, CP 91073, Mexico; ²Universidad Veracruzana, Facultad de Biología. Xalapa, CP 91000, Mexico. zS18020302@estudiantes.uv.mx

Palabras clave: Dinámica molecular; Quorum sensing; Receptor de jasmonatos.

Introducción. Las plantas y los microorganismos se comunican a través de señales químicas, mediante el intercambio y la percepción de biomoléculas, tanto de origen vegetal como bacteriano[1]. Estas interacciones influyen directa o indirectamente en la inmunidad, crecimiento y/o morfogénesis de las plantas. Se ha descrito que diferentes moléculas que participan en el *quorum sensing* bacteriano pueden mimetizar compuestos vegetales endógenos y modificar los patrones de crecimiento y desarrollo de las plantas [2] Un ejemplo es la p-coumaroil-L-homoserina lactona (pC-HL), producida por *Rhodopseudomonas palustris*, la cual induce respuestas de resistencia a patógenos [3]. Los efectos del pC-HL *in vitro* indican que la respuesta mediada por ácidos jasmónico (COI1) podría ser la ruta de señalización de este compuesto. Nuestro objetivo es simular mediante dinámica molecular, las posibles interacciones moleculares del pC-HL vs receptores de ácido jasmónico, para determinar si podría funcionar como posible blanco molecular.

Metodología.



Resultados.

1. Efecto del pC-HL sobre el crecimiento radicular. Diferentes concentraciones de pC-HL aplicadas a diversas líneas de *A. thaliana* mostraron que la longitud radicular se ve afectada (Fig. 1). Este fenómeno sugiere que los receptores de jasmonatos (COI1) podrían funcionar como elementos receptores para el reconocimiento de pC-HL.



Fig. 1. Efecto del pC-HL en el crecimiento radicular en *Arabidopsis thaliana*. Las líneas mutantes de *A. thaliana* incluyen WT (col0), la mutante nula (coi1) y la variante resistente a jasmonatos (jar1).

2. Simulación por dinámica molecular de los complejos COI1 – pC-HL.

Para generar un modelo de interacción intermolecular, se simularon las estructuras de COI1 co-cristalizadas con (+)-7-iso-Jasmonil-L-isoleucina (7JI) (PDB 3OGL) o acopladas a pC-HL mediante dinámica molecular convencional (cMD) y acelerada por funciones Gaussianas (GaMD). La estructura de COI1 se modeló con los campos de fuerza ff14SB y GAFF incluidos en el paquete Amber20 (185,000 átomos: 760 aa y 57,340 aguas TIP3P) y se evaluaron 250 ns de simulación por cMD y 500 ns de simulación por GaMD. El análisis de RMSD de los carbonos alfa de la proteína sugiere que la presencia de pC-HL en el sitio de unión de COI1 induce conformaciones similares a las mostradas por 7JI (Fig.2). Asimismo, el análisis de las interacciones intermoleculares mostró que pC-HL interacciona con residuos de aminoácidos clave como lo hace el ligante natural (R85, F89, R348, R409 y W519).

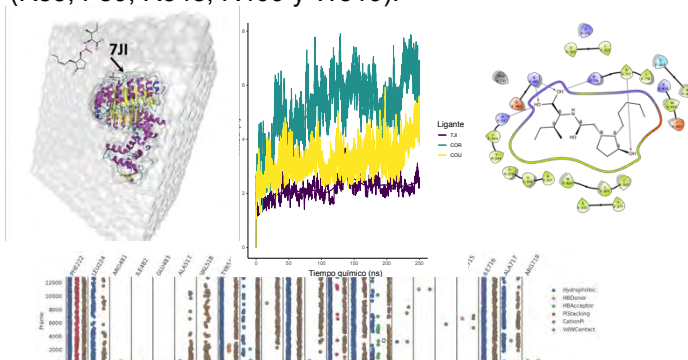


Fig 2. Elementos de análisis de la dinámica molecular del receptor de jasmonatos y pC-HL.

Conclusiones. Los resultados sugieren que pC-HL podría ser un mimético de la ruta de jasmonatos.

Agradecimiento. La autora de este trabajo agradece la beca otorgada por la REFEP para la presentación de este trabajo.

Bibliografía.

- Bais, H. P., Park, S. W., Weir, T. L., Callaway, R. M., & Vivanco, J. M. (2004). *Trends Plant Sci.* Vol (9): 26-32.
- Barrera-Ortiz, S., López-García, C. M., Ortiz-Castro, R., Guevara-García, A. A., & López-Bucio, J. (2022). *J. Plant Growth Regul.* Vol (41): 376-390.
- Du, X., Huang, R., Zhang, Z., Zhang, D., Cheng, J., Tian, P., Wang, Y., Zhai, Z., Chen, L., Kong, X., Liu, Y., & Su, P. (2021). *J Phytopathol (1986).* Vol (111): 500-508.

Comparación de la composición bioquímica y la actividad biológica del veneno de *Crotalus basiliscus*, *Crotalus molossus molossus* y *Crotalus molossus oaxacus*

Areli Gutierrez-Martinez, Miguel Borja, Bruno Rodríguez, Jorge Becerra-López, Sara Valenzuela-Ceballos, Gamaliel Castañeda-Gaytán. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, Dgo., C.P. 35010. Edgar Neri-Castro, Vanessa Zazosa, Alejandro Alagón. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., C.P. 62210. areligtzbio@gmail.com

Palabras clave: veneno de serpiente, variación ontogénica, variación interespecifica.

Introducción. El complejo *Crotalus molossus* es uno de los grupos de serpientes venenosas más ampliamente distribuido en México. El complejo lo integran seis especies: *C. basiliscus*, *C. molossus molossus*, *C. molossus nigrescens*, *C. molossus oaxacus*, *C. ornatus* y *C. totonacus* (1). Únicamente se ha caracterizado el veneno de *C. basiliscus* (2) y *C. molossus nigrescens* (3), en donde se observó variación asociada a la longitud de los individuos (ontogénica). Los individuos con longitudes menores a 70 cm presentaron mayor cantidad de miotoxinas, mientras que en los individuos con longitudes mayores a 70 cm predominaron las metaloproteinasas. Así mismo *C. basiliscus* es la única especie en la cual se ha reportado la presencia de componentes neurotóxicos, lo que sugiere variación interespecifica.

Por lo anterior, se busca evaluar la composición bioquímica y la actividad biológica del veneno de tres de las especies del complejo: *C. basiliscus*, *C. m. molossus*, *C. m. oaxacus*, así como determinar si existe variación ontogénica e interespecifica.

Metodología. Se analizaron los venenos de 6 individuos de cada especie con diferentes longitudes. La caracterización bioquímica del veneno se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) (2). Para evaluar la actividad biológica, se realizaron ensayos de actividad fibrinogenolítica, y ensayos de dosis letal media (DL50) para determinar la toxicidad (3).

Resultados. En los perfiles obtenidos por SDS-PAGE y PR-HPLC, se identificó una relación entre la composición del veneno con la longitud hocico cloaca (LHC) de los individuos de *C. m. molossus* y *C. basiliscus*. Los individuos con longitudes menores a 70 cm mostraron mayor presencia de miotoxina (MYO) y serinoproteasas (SVSPs). Mientras que los individuos con longitudes mayores a 70 cm mostraron mayormente metaloproteasas (SVMPs) y fosfolipasas (PLA₂) (**Fig. 1A,1B**). Los individuos de *C. m. oaxacus*

con longitudes menores a 70 cm mostraron más presencia de serinoproteasas (SVSPs) y metaloproteasas de tipo III (PIII-SVMPs). Mientras que en los individuos con longitudes mayores de 70 cm predominaron las fosfolipasas (PLA₂) y las metaloproteasas de tipo I y II (PI, PII-SVMPs) (**Fig. 1C**).

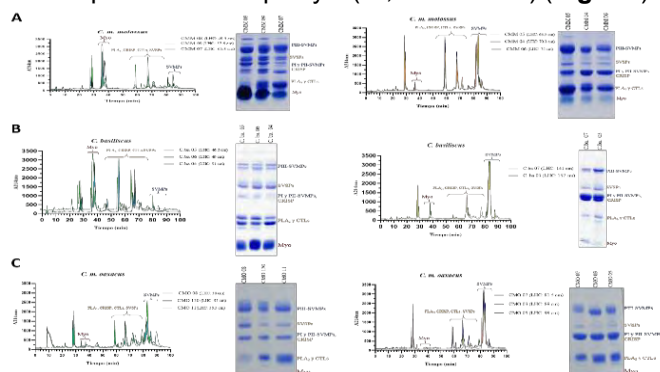


Fig. 1. SDS-PAGE (12.5%) y PR-HPLC (A_{214nm}) del veneno de *C. m. molossus* (A), *C. basiliscus* (B) y *C. m. oaxacus* (C) de diferentes LHC.

Conclusiones. Se observó una variación en la composición del veneno con respecto a la LHC, principalmente en la presencia y abundancia de MYO, SVSP, SVMP y PLA₂ concordando con lo reportado para especies del complejo *C. molossus* (2,3). La variación ontogénica se observó principalmente en *C. m. molossus* y *C. basiliscus*. Por su parte *C. m. oaxacus*, mostró un patrón distinto, careciendo en gran medida de MYO en todos los individuos evaluados.

Agradecimiento. La elaboración de este proyecto fue financiada por CONACYT(FORDECYT-PRONACES/1715618/2020).

Bibliografía.

Muñoz-Mora, H., Suárez-Atilano, M., Maltagliati, F., Ramírez-Corona, F., Carbajal-Saucedo, A., Percino-Daniel, R., Langeneck, J., D'Addario, M., Sunny, A. (2022) *Herpetozoa*. Vol (35): 141-153.
Colis-Torres, A., Neri-Castro, E., Strickland, J.L., Olvera-Rodríguez, A., Borja, M., Calvete, J., Jones, J., Parkinson, C.L., Bañuelos, J., López de León, J., Alagón, A. (2022) *Biochimie*. Vol (192):111-124.
Borja, M., Neri-Castro, E., Pérez-Morales, R., Strickland, J.L., Ponce-López, R., Parkinson, C.L., Espinosa-Fematt, J., Sáenz-Mata, J., Flores-Martínez, E., Alagón, A., Castañeda-Gaytán, G. (2018). *Toxins*. Vol (10): 1-27.

ESTRUCTURA Y FILOGENIA DE SUBUNIDADES A Y B DE CROTOXINA

Hernández Herrera David, Flores Tinajero Cesar Antonio, Reyes Chaparro Andrés. Instituto Politécnico Nacional (Departamento de Morfología ENCB y Departamento de Farmacia), Ciudad de México (11350), dh0719668@gmail.com Hernández Herrera David.

Palabras clave: Crotoxina, Genes, Enzimas

Introducción. La crotoxina es una enzima del veneno de los viperidos que representa el 50 % del peso seco y compuesta de dos subunidades, una básica y una ácida, (Neri, et al, 2014). Es una fosfolipasa A₂ que fue aislada de *Crotalus durissus cumanaensis* y es responsable de la acción neurotóxica del veneno (Sampaio, et al, 2010). Por otro lado, se conocen diferentes variantes de crotoxina y esto influye en la toxicidad del veneno; especies venenosas de Sudamérica se caracterizan por una acción neurotóxica, mientras que en las regiones de Norteamérica se considera con una acción hemotóxica principalmente (Hernández, 2015).

Establecer una relación filogenética en diferentes especies de viperidos de las subunidades de la crotoxina, para posteriormente compararlas mediante técnicas bioinformáticas.

Metodología. Por medio de las bases de datos de NCBI GenBank y Protein Data Bank se extrajeron las secuencias de proteínas y genes codificantes para las subunidades de la crotoxina, para posteriormente determinar una comparación entre diez especies de viperidos como lo son *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus scutulatus*, *Crotalus tigris*, *Crotalus tzabcan*, *Crotalus scutulatus salvini*, *Bothrops jararacussu*, *Crotalus viridis viridis*, *Crotalus atrox*, *Crotalus basiliscus*, *Bothriechis schlegelii*. De este modo se obtuvo un porcentaje de similitud de los organismos respecto a la enzima y secuencia de genes, así como las estructuras con la plataforma SWISS-MODEL.

Resultados.

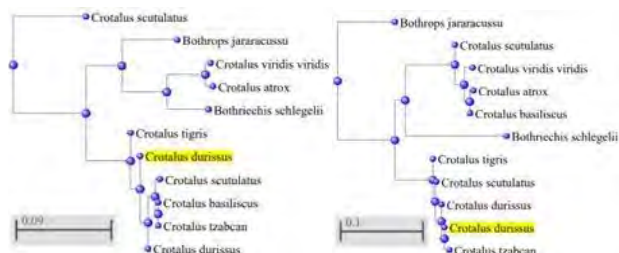


Fig. 1. Cladogramas de las especies de viperidos donde la derecha es respecto a crotoxina A y la izquierda de crotoxina B, donde lo resaltado en amarillo es la especie de referencia.

Tabla 1 Porcentaje de similitud de las secuencias de DNA comparadas con *Crotalus durissus terrificus*.

| Especie | % A | % B |
|------------------------------|--------|--------|
| <i>C. durissus</i> | 100% | 100% |
| <i>C. scutulatus</i> | 98.01% | 75% |
| <i>C. tigris</i> | 98.08% | 97.92% |
| <i>C. tzabcan</i> | 99.76% | 100% |
| <i>C. scutulatus salvini</i> | 88.99% | 81.5% |
| <i>B. jararacussu</i> | 80.72% | 85.17% |
| <i>C. viridis viridis</i> | 85.46% | 87.89% |
| <i>C. atrox</i> | 85.68% | 87.53% |
| <i>C. basiliscus</i> | 85.20% | 100% |
| <i>B. schlegelii</i> | 83.37% | 86.52% |

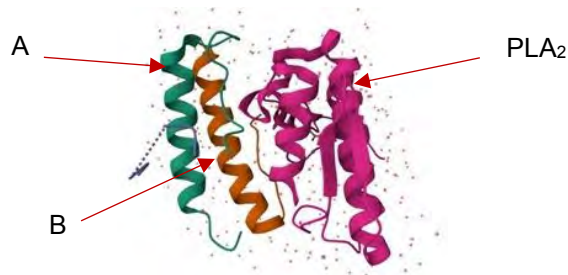


Fig.2. Estructura de la Crotoxina con sus subunidades, denotando de naranja la crotoxina B, verde la crotoxina A y rosa una fosfolipasa A₂ (PLA₂). Imagen extraída de Protein Data Bank (PDB)

Conclusiones. La relación filogenética indica la cercanía de los organismos por medio de la crotoxina, así como se encuentran diferencias estructurales en las mismas al analizar sus secuencias por medio de la bioinformática, por lo que se asume es una forma de divergencia biológica de las diferentes especies analizadas.

Agradecimiento. A el departamento de morfología y farmacia de la ENCB perteneciente al IPN por el apoyo teórico en la realización del presente y por proporcionar los programas utilizados en el análisis bioinformático.

Bibliografía.

- Hernández, I. (2015). Crotoxina en el veneno de la serpiente de cascabel *Crotalus simus* en México: su relación con la toxicidad y distribución geográfica. [Proyecto de tesis]. UNAM. México. Enero, 2015. 1-65
- Neri, E., Bénard, M. y Alagón, C. (2014). *RDU*. 15(11). 1-8
- Sampaio, S., Hyslop, S. Fontes, M., Prado, J., Zambelli, V. Magro, A., Brigatte, P. Gutierrez, V. y Cury, Y. (2010). *ELSEVIER*. 55. 1045-1060

LA S-GLUTATIONILACIÓN DE LA CRISTALINA γ D HUMANA DISMINUYE LA AGREGACIÓN INDUCIDA POR CU(II) E IMPIDE SU REDUCCIÓN A CU(I) *IN VITRO*

Uc Santos Eusebio, Schuth Nils, Quintanar Vera Liliana.

Departamento de Química, CINVESTAV. Ciudad de México, 07360.

Eusebio.uc@cinvestav.mx

Palabras clave: cataratas, cristalinas, cobre

Introducción

Las cataratas son resultado de la agregación de complejos proteicos de alto peso molecular en el cristalino, que provocan dispersión de la luz y pérdida de la transparencia.¹ La γ D cristalina humana (H γ D) es una de las proteínas más abundantes del cristalino, siendo una de las proteínas más estables del cuerpo humano; sin embargo, el Cu(II) puede inducir su agregación *in vitro*² mediante diferentes mecanismos, que incluyen la formación de puentes metálicos, el desplegamiento parcial de la proteína, la formación de enlaces disulfuro, y la formación de radicales libres por la reducción de Cu(II) a Cu(I).³ H γ D posee residuos de cisteína (Cys) que pueden estar involucrados en la coordinación a cobre y la reducción de Cu(II) a Cu(I),² y la mutación de residuos de Cys tiene un impacto importante en la agregación y formación de puentes disulfuro de esta proteína.⁴

En el presente trabajo, se analizará el impacto de la glutatiónilación de cisteínas en la agregación y reducción de Cu(II) en la H γ D cristalina. Así mismo, se caracterizarán los sitios de coordinación a Cu en la proteína nativa (H γ D WT) y glutatiónilada (H γ D GSH), mediante métodos espectroscópicos.

Metodología.

La H γ D cristalina nativa y mutantes se produjeron de manera recombinante utilizando cepas de E. coli BL21 transformadas con los plásmidos correspondientes.² Las proteínas se purificaron mediante Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC), y posteriormente se redujeron con ditioneitol (DTT). Para la modificación química de Cys, se hizo reaccionar la proteína nativa purificada con glutatión oxidado (GSSG),⁴ y se identificó los residuos de Cys modificados por Espectrometría de Masas en tándem (MS/MS). Una vez obtenidas las proteínas purificadas y concentradas, se realizaron ensayos de agregación para evaluar la susceptibilidad de la proteína nativa y glutatiónilada a la agregación inducida por Cu; las soluciones obtenidas tras los ensayos de agregación se analizaron por SDS-PAGE para evaluar la formación de enlaces disulfuro.^{2,3} Así mismo, se evaluó la reducción de Cu(II) a Cu(I) y la estructura de los complejos de Cu(II) y Cu(I) mediante Resonancia Paramagnética (EPR) y Absorción de Rayos X (XAS).³

Resultados

La espectrometría de masas de H γ D GSH muestra la reacción parcial no específica del GSSG con los residuos Cys18, Cys41 y Cys110. (Fig 1 D). La glutatiónilación de H γ D disminuye la agregación inducida por Cu(II) (Fig 1B), requiriendo un mayor número de equivalentes de Cu(II) (10 equiv) para mostrar una agregación comparable a la observada en la H γ D WT a 2 equivalentes, así como una disminución en la formación de puentes disulfuro *in vitro* (Fig 1C).

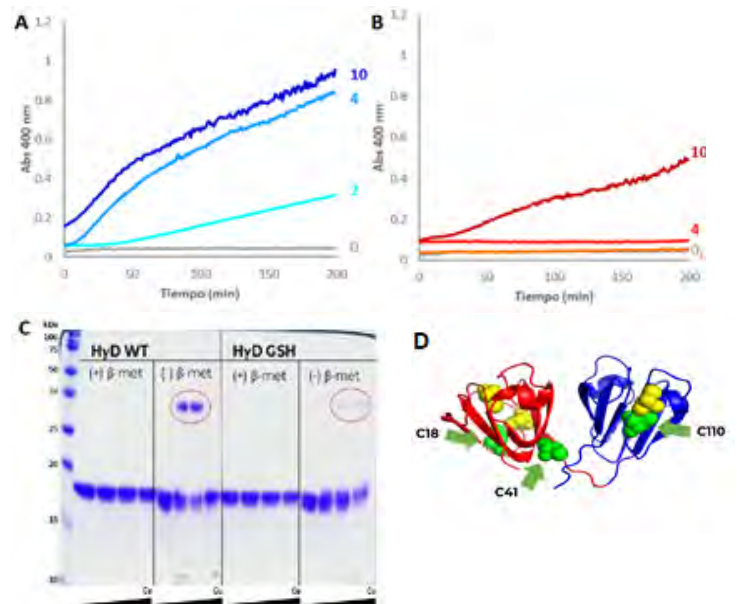


Fig. 1. A) Ensayo de agregación de H γ D cristalina WT (50 μ M) a 0, 2, 4 y 10 eq de Cu(II) (trazas azules). B) Ensayo de agregación de H γ D GSH (50 μ M) a 0, 2, 4 y 10 eq de Cu(II) (trazas rojas). Se observa una disminución de la agregación inducida por Cu(II). C) SDS-PAGE de las soluciones resultantes de los ensayos de agregación de H γ D WT y H γ D GSH en condiciones reductoras y no reductoras. Se observa una mayor formación de dímeros enlazados por disulfuros en la H γ D WT D) Residuos de Cys glutatiónilados en la H γ D cristalina, identificados por MS/MS.

Así mismo, se obtuvieron espectros de EPR de H γ D WT (Fig 2.1) y H γ D GSH (Fig 2.3) a diferentes equivalentes de Cu(II). H γ D WT mostró una disminución en la cuantificación de spin de Cu(II) de

alrededor de 1 equivalente en todos los espectros analizados. (Tabla 1) Éstos resultados sugieren que el primer equivalente de Cu(II) se reduce a Cu(I) en presencia de la proteína nativa. Con respecto a HyD GSH, no existe disminución en la señal observada, teniendo a 1 equivalente de Cu(II) una intensidad de señal comparable a la observada en la proteína nativa a 2 equivalentes de Cu(II) (Fig 2.3). No se observó disminución de la cuantificación de spin (Tabla 1), indicando que la reducción de Cu(II) a Cu(I) se encuentra impedida en la proteína glutationilada, y que un residuo de Cys resulta fundamental para dicho proceso redox.

Tabla 1. Cuantificación de spin en HyD WT y HyD GSH

| Equivalentes de Cu(II) | HyD WT | HyD GSH |
|------------------------|--------|---------|
| 0.5 | 16% | - |
| 1.0 | 20% | 110% |
| 1.5 | 31% | - |
| 2.0 | 54% | 120% |
| 3.0 | 64% | - |

Con respecto a los espectros de XAS de banda K, HyD WT mostró un pico a 8983 eV (Fig 2.2), característico de especies de Cu(I) lineales o trigonales⁵, el cual no se observa en los espectros de HyD GSH (Fig 2.4), indicando la ausencia de complejos de Cu(I) en la proteína glutationilada.

Conclusiones.

La glutationilación de residuos de Cys en HyD disminuye la agregación y la formación de enlaces disulfuro inducidas por Cu(II) *in vitro*. Así mismo, dicha modificación química impide la reducción de Cu(II) a Cu(I), mostrando que dichas Cys son necesarias para dicho proceso redox.

Agradecimientos.

Queremos agradecer al CINVESTAV y CONACYT por brindar los recursos y equipos necesarios para este proyecto.

Bibliografía.

- Moreau K. L. and King, J. A. (2012). Trends in molecular medicine, 18(5), pp. 273–282.
- Quintanar L., Domínguez-Calva A., Serebryany E., Rivillas-Acevedo L., Haase-Pettingel C., Amero C, King J. (2016). ACS chemical biology, 11(1), pp. 263–272.
- Palomino-Vizcaino, G., Schuth, N., Domínguez-Calva, J. A., Rodríguez-Meza, O., Martínez-Jurado, E., Serebryany, E., King, J. A., Kroll, T., Costas, M., & Quintanar, L. (2023). Journal of the American Chemical Society, 145(12), 6781–6797.
- Ramkumar, S., Fan, X., Wang, B., Yang, S., & Monnier, V. M. (2018). Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease, 1864(11), 3595–3604.
- Kau, L. S., Spira-Solomon, D. J., Penner-Hahn, J. E., Hodgson, K. O., & Solomon, E. I. (1987). Journal of the American Chemical Society, 109(21), 6433–6442.

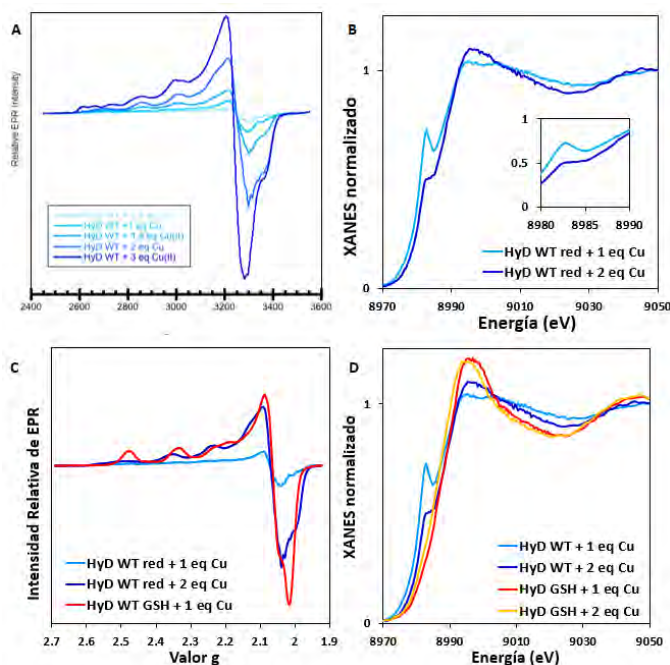


Fig. 1. A) Espectros de EPR a 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 equivalentes de Cu(II) en HyD WT (310 μM) (trazas azules). B) Espectros de XAS de HyD WT a 1.0 y 2.0 eq de Cu(II). Se observa la presencia de especies de Cu(I) coordinadas lineal o trigonalmente. C) Espectro de EPR a 1.0 equivalente de Cu(II) en HyD GSH (290 μM) (traza roja). D) Espectros de XAS de HyD WT (trazas azules) y HyD GSH a 1.0 y 2.0 eq de Cu(II) (trazas rojas). No se observa la presencia de especies de Cu(I) en la proteína glutationilada.

Caracterización genómica del veneno en el complejo *Crotalus molossus*: un enfoque pangénomico

Bruno Rodríguez López¹, Gamaliel Castañeda-Gaytan¹, Juan Miguel Borja-Jimenez¹, Jason L. Strickland² y Samuel Richard Hirst³

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad s/n. Fracc. Filadelfia, C.P. 35010 Gómez Palacio, Dgo., México.

² Department of Biology, University of South Alabama, Mobile, AL 36688, USA

³ Department of Integrative Biology, University of South of Florida, Tampa, FL 33620, USA

Palabras clave: Pangenoma venomico, Complejo Crotalus molossus, Genomas

Introducción. El Complejo *Crotalus molossus* está constituido de seis especies, las cuales tienen una amplia distribución en México. Se ha observado que algunas de las especies del complejo presentan variabilidad proteómica de las familias de toxinas del veneno a nivel intra específico y ontogenético, como lo son *C. basiliscus* y *C. m. nigrescens*, sin embargo, se desconoce si esta variabilidad persiste para todo el complejo aun nivel genómico.

Nosotros secuenciamos y anotamos los genes de las toxinas del veneno para cinco especies del complejo *Crotalus molossus*, de esta manera generamos por primera vez un pangenoma venomico de especies filogenéticamente cercanas.

Metodología. Se secuencio el genoma de cinco ejemplares (*C. m. molossus*, *C. m. nigrescens*, *C. m. oaxacus*, *C. basiliscus* y *C. ornatus*) del Complejo *Crotalus molossus* con tecnología PacBio. Las lecturas resultantes se ensamblaron con Hifiasm (Cheng et al., 2021) y la anotación de los genes de las toxinas del veneno se realizo con GeMoMa (Keilwagen et al., 2016), finalmente el curado y verificación de cada gen de las familias de toxinas del veneno se realizo con Geneious.

Resultados.

Los estadísticos de los ensamblados se muestran en la tabla 1. Se identificaron 19 Familias de toxinas, de los cuales se anotaron de 76 a 91 genes de toxinas para el complejo *Crotalus molossus*. Los resultados muestran que existe una variación en el número de genes por familia de toxinas, la ausencia de la myotoxina para el caso de *C. m. oaxacus*, la presencia de los genes de la fosfolipasa neurotoxina (PLA2-B2 y PLA2-A2) y la variación

del numero de genes de metaloproteinasas y para cada una de las especies (Fig. 1ab).

Tabla.1. Estadísticos de los ensamblados.

| | <i>C. basiliscus</i> | <i>C. m. molossus</i> | <i>C. m. nigrescens</i> | <i>C. m. oaxacus</i> | <i>C. ornatus</i> |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------|
| Tamaño del ensamblado, Gb | 1.82 | 1.61 | 1.622 | 1.6 | 1.69 |
| Numero de Scaffold | 4081 | 1265 | 1396 | 1990 | 1441 |
| Scaffold L50, N50 Mb | 355 / 1.19 | 12 / 36.76 | 12 / 36.864 | 24 / 17.47 | 38 / 10.04 |
| Numero de contigs | 4081 | 1265 | 1396 | 1990 | 1441 |
| GC % | 40.13 | 40.06 | 40.09 | 40.09 | 40.29 |
| Cobertura del largo genoma % | 98.53 | 98.8 | 99.08 | 98.43 | 99.14 |
| Cobertura genoma (X) | 11.16 | 19.06 | 21.15 | 19.91 | 16.29 |

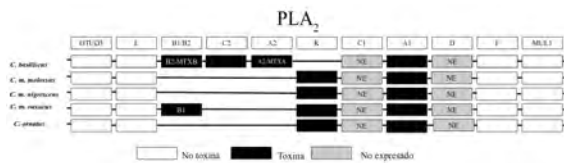


Fig.1a. Arreglo genómicos de los genes de la familia de toxina de la PLA₂. Genes de las toxinas son mostrados con un cuadro negro. Genes de no toxinas de los extremos (e.g., MUL1) son mostrado con un cuadro blanco. Nomenclatura tomada de Dowell et al., 2016.

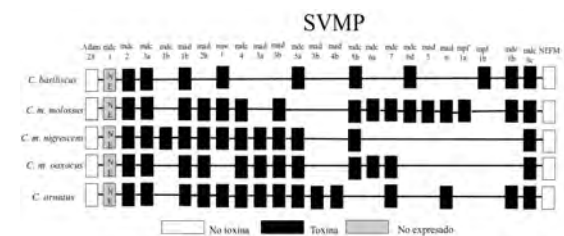


Fig.1b. Arreglo genómico de los genes de la familia de toxina de la SVMP. Genes de las toxinas son mostrados con un cuadro negro. Genes de no toxinas de los extremos (e.g., Adam 28) son mostrado con un cuadro blanco.

Conclusiones. Las variaciones en los arreglos genómicos de la familia de toxinas tendrían implicaciones en la funcionalidad del veneno del Complejo *Crotalus molossus*.

Agradecimiento. Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca asignada a Bruno Rodríguez López

Bibliografía.

Cheng, H., Concepcion, G. T., Feng, X., Zhang, H., & Li, H. 2021. Haplotype-resolved de novo assembly using phased assembly graphs with hifiasm. *Nature methods*, 18(2), 170–175.

Keilwagen, J., Wenk, M., Erickson, J. L., Schattat, M. H., Grau, J., & Hartung, F. 2016. Using intron position conservation for homology-based gene prediction. *Nucleic acids research*.

ANÁLISIS *IN SILICO* DE HOT SPOTS EN POLIMERASAS REPLICATIVAS Y SU RELACIÓN CON CÁNCER DE TIPO GINECOLÓGICO.

Kayley Aileen Hernández Ramírez*, Silvia Armenta Jaime**, Instituto de Ciencias Agropecuarias Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Avenida Universidad Km. 1 s/n Exhacienda Aquetzalpa, 43600 Tulancingo de Bravo, Hgo., he35727@uaeh.edu.mx*, silvia_armenta@uaeh.edu.mx**

Palabras clave: polimerasas replicativas, cáncer, hot spots.

Introducción. La Secretaría de Salud del Estado de Hidalgo reporta que el cáncer de mama y de cuello uterino encabezan las causas de defunción por este tipo de tumor en mujeres (1). El creciente número de casos de cáncer representa un desafío en la salud pública, por ello, en este trabajo se plantea un enfoque *in silico* que proporcione información relevante sobre las bases moleculares de esta enfermedad que puedan llegar a contribuir al desarrollo de estrategias de diagnóstico temprano y personalización de tratamientos.

En diferentes estudios y bases de datos se ha reportado la relación entre estos tipos de cáncer y mutaciones (hotspots) en proteínas involucradas en la replicación del DNA, entre ellas las polimerasas δ y ϵ , en las cuales se han encontrado mutaciones que podrían explicar los mecanismos de acción en líneas cancerígenas. Estas polimerasas tienen como principales dominios el exonucleasa, y de actividad catalítica, siendo que la mayoría de las mutaciones se presentan en los dominios exonucleasa de los genes POLE y POLD1, asociados con una alta tasa de mutación y la iniciación de múltiples tipos de cáncer (2).

Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo realizar un estudio *in silico* de los hotspots de las polimerasas δ y ϵ en los dominios exonucleasa de los genes POLE y POLD1, para identificar y predecir el efecto funcional de las mutaciones identificadas utilizando herramientas bioinformáticas y evaluar el impacto potencial de las mutaciones y su relación con la carcinogénesis.

Metodología. Se utilizó la plataforma de estudios genómicos del cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>), la cual recopila datos relacionados a diferentes tipos de cáncer, para buscar mutaciones en genes de dos polimerasas (polimerasas δ y ϵ) y su relación con cáncer ginecológico. Se seleccionaron los hotspots de mayor relevancia, mismos que fueron visualizados en la estructura tridimensional obtenidas del (Protein Data Bank) PDB (<https://www.rcsb.org/>). Para posteriormente hacer un análisis estructura-función respecto a las mutaciones seleccionadas.

Resultados.

Tabla 1. Mutaciones seleccionadas de los genes POLE y POLD1.

| Gen | Mutaciones | | |
|-------|----------------|--------|-------|
| | Tipo de cáncer | | |
| Gen | Mama | Ovario | Útero |
| POLE | E18K | N1869K | P286R |
| | P286T | T2245N | V411L |
| | I211K | R1037S | P436R |
| POLD1 | R211H | P1102A | P787L |
| | I610M | I868M | L606V |
| | R521W | Y701N | S478N |

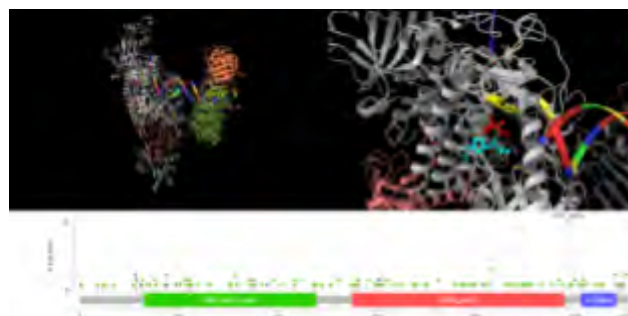


Fig. 1. a) Estructura tridimensional de la proteína 6TNY (POLD1), con un acercamiento de las mutaciones seleccionadas (3). b) Gráfica lollipop de mutaciones en el gen POLD1.

Conclusiones. Se observó que las mutaciones que han sido relacionadas con el cáncer ginecológico se localizan en una región próxima al sitio de interacción con la cadena de DNA sintetizada y dentro del dominio exonucleasa, sin embargo, en el caso de cáncer de ovario existen mutaciones mayoritariamente en la región amino terminal de la polimerasa, por lo que es relevante realizar un análisis profundo del efecto de las mutaciones con respecto a las diferentes interacciones de la maquinaria de replicación del DNA.

Bibliografía.

1. Secretaría de Salud de Hidalgo. (2019) Exhorto Ref. a Cáncer.
2. Yin Y, Yang L, Yin JC, et al. (2021) *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*.
3. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. (2021) *Protein Sci.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers.

Proteínas

EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA BIESPECÍFICA BASADA EN DOMINIOS VNAR: CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR *IN SILICO*

Jessica Andrea Badillo Mata¹, Joel Armando Sotomayor Peña¹, Mirna Burciaga Flores¹, Hugo Esquivel Solís², Pavel Hayl Lugo Fabres², Tanya Amanda Camacho Villegas^{2*}, ¹Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica (UBMF, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), A.C., Guadalajara 44270. ²CONAHCYT-UBMF. *jebadillo_al@ciatej.edu.mx

Palabras clave: vNAR, citocinas, inmunoterapia

Introducción. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citocina clave en la defensa del huésped, sin embargo, su producción excesiva o persistente en humanos ocasiona inmunopatologías. El factor de crecimiento transformante beta (TGF β) es una citocina que en altas concentraciones ocasiona fibrosis debido a que induce la remodelación de la matriz extracelular (ECM). Clínicamente se han empleado anticuerpos monoclonales que neutralizan citocinas resultando en el control o remisión de enfermedades. Los dominios vNAR presentan ventajas como inmunoterapéuticos sobre los anticuerpos monoclonales, asociado a su tamaño (12-15 kDa) y termoestabilidad.

El objetivo del presente trabajo es simular *in silico*, expresar, extraer y purificar la proteína biespecífica T1-L-T43.

Metodología. Partiendo de las secuencias previamente reportadas de los vNAR T1¹ anti-TGF β y del vNAR T43² anti-TNF α , se simuló *in silico* el plegamiento de la proteína biespecífica empleando los programas CLC DNA Workbench y RaptorX. Para el modelado, se emplearon como PDB ID 1VES; 7E7Y. Adicionalmente, se amplificaron los genes sintéticos de T1-L-T43 incluyendo sitios de restricción (NcoI/NotI). Se clonaron en el vector pET28a+ y se transformaron células *E. coli* BL21 para expresar la proteína con 1mM de IPTG. La proteína biespecífica se extrajo y purificó bajo condiciones desnaturizantes. Después del plegamiento, se analizó en un gel 12% SDS-PAGE teñidos con azul de Comassie.

Resultados. En la Fig.1, se muestra un esquema del diseño de la proteína biespecífica T1-L-T43.

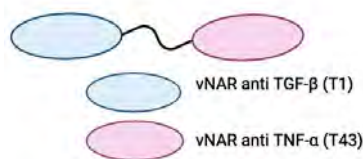


Fig. 1. Representación esquemática de la proteína biespecífica basada en dominios vNAR: T1-L-T43.

Se analizaron *in silico* las propiedades fisicoquímicas de la proteína T1-L-T43. Resultando en un tiempo de vida media 4.4 h en mamíferos, un índice alifático de 63.27 y punto isoeléctrico de 7.52. La simulación del plegamiento muestra que los dominios vNAR no interactúan sobre si mismos, por lo tanto, es probable que mantengan su especificidad individual hacia la citocina correspondiente. Posteriormente, se realizó la inducción, extracción y purificación de T1-L-T43 en condiciones desnaturizantes. Se observó que la proteína eluida tiene un peso molecular de ~35 kDa (Fig. 2), indicando que es posible la expresión en *E. coli*. A partir de la segunda elusión, se encuentra la mayor cantidad de proteína recombinante.

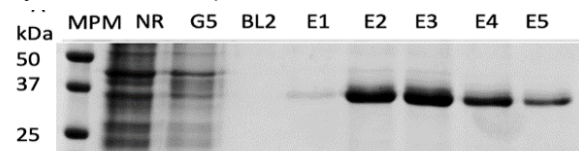


Fig. 2. Evaluación en SDS-PAGE. Evaluación correspondiente a la purificación de la proteína T1-L-T43. MPM: marcador de peso molecular. NR: proteína no retenida en la resina. G5: buffer con gradiente de urea 5M. BL2: Buffer de Lavado 2. E1-E5: número de las eluciones.

Conclusiones. La proteína biespecífica T1-L-T43 presenta cualidades relevantes y prometedoras para ser considerada como una opción de inmunoterapia basada en dominios vNAR neutralizantes de citocinas humanas. Además, puede ser expresada en *E. coli*, extraerse bajo condiciones desnaturizantes y ser plegada como una proteína de ~35 kDa. Es necesario realizar ensayos que demuestren el mantenimiento de la especificidad de la proteína biespecífica.

Agradecimiento. A CONAHCYT por la beca otorgada a la M. C. Jessica Andrea Badillo Mata (845947).

Bibliografía.

1. Camacho-Villegas, T., Mata-Gonzalez, T., Paniagua, J., Sanchez, E. y Licea, A. (2013) *MABs*. 5 (1): 80-85.
2. Burciaga-Flores, M., Márquez-Aguirre, A.L., Dueñas, S. et al. (2023) *Sci Rep*. 13 (1).
3. Khalid, Z., Chen., Y, Yu D. et al. (2022) *Fish Shellfish Immunol*. 121 (1): 467-477.

EVOLUCIÓN DE *BLC230* Y *XyIF* PARA OPTIMIZAR LA DEGRADACIÓN DE CATECOL EN BIOFÁBRICAS NO-PATÓGENAS

Rafael García-Gómez, M. Fernanda Fonseca-Fonseca, J. Donato García-García. Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Av. General Ramón Corona 2514, Nuevo México, C.P. 45138, Zapopan, Jalisco, México.

Palabras clave: Catecol, Ingeniería de proteínas, Biofábricas

Introducción. El catecol, compuesto orgánico fenólico, representa una amenaza para los ecosistemas acuáticos y terrestres por ser altamente tóxico para la salud animal y vegetal (1). Se ha reportado una ruta de degradación de catecol en *Pseudomonas* sp. que consiste en cuatro enzimas (**Figura 1**) llevando a la formación de piruvato y acetaldehído, intermediarios de la gluconeogénesis (2). *Escherichia coli* BL21 no cuenta con las enzimas catecol 2,3-dioxigenasa y 2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa como parte de sus rutas nativas, pero es capaz de expresar las dos últimas enzimas presentes en la ruta de *Pseudomonas* sp. (3).

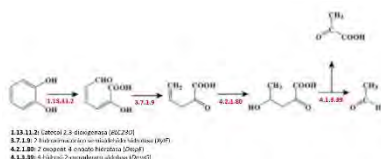


Figura 1. Ruta metabólica de la degradación del catecol en *Pseudomonas* sp. (2).

El propósito de esta investigación consiste en optimizar la degradación del catecol en *Escherichia coli* BL21 mediante la inserción de *BLC230* y *XyIF* (las dos primeras enzimas degradadoras de catecol). Primero, se sobreexpresarán las enzimas *wild-type*, y después se evolucionarán mediante OrthoRep (evolución dirigida continua) hasta observar un fenotipo favorable.

Metodología. Se llevó a cabo la clonación de los genes *BLC230* (AJ344068.1) y *XyIF* (NW_013563322) en el vector pET28b en *E. coli* TOP10. Posteriormente, se clonaron en *E. coli* BL21 para la inducción de la co-expresión proteica con IPTG. Se realizó un SDS-PAGE para verificar la presencia de ambas enzimas. Para evaluar el fenotipo, se realizaron una serie de lavados en precultivos de *E. coli* BL21, que fueron cultivados en medio M63 enriquecido con MgSO₄, IPTG, tiamina y kanamicina. Después, se suplementó catecol a concentraciones de 5, 10 y 15 mM, junto a un control sin catecol. Tras 24 horas de incubación, se midió la OD₆₀₀ para analizar crecimiento celular. En paralelo, los genes *BLC230* y *XyIF* se clonaron en el sistema OrthoRep para iniciar el proceso de evolución dirigida continua.

Resultados. La co-expresión de las enzimas *BLC230* y *XyIF* en *E. coli* BL21 se llevó a cabo correctamente. En la **Figura 2**, se observa un patrón de bandas entre 25 y 35 kDa, que corresponde al rango para el peso molecular teórico cada enzima, de 31.83 y 30.47 kDa, respectivamente.

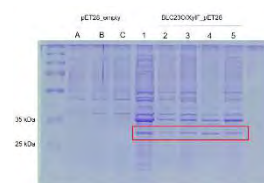


Figura 2. SDS-PAGE de las enzimas *BLC230* y *XyIF*.

Los resultados preliminares de la medición de la OD₆₀₀ muestran un mayor crecimiento a una concentración de 10 mM. Sin embargo, se aumentará el número de réplicas. Adicionalmente, se clonó el gen *BLC230* en el sistema OrthoRep.

Conclusiones. La inserción de las enzimas *wild-type* *BLC230* y *XyIF* en *E. coli* BL21 permitió observar crecimiento celular en presencia de catecol como única fuente de carbono. Adicionalmente, se concluye que *E. coli* BL21 es una plataforma adecuada para evaluar el crecimiento bacteriano en presencia de fuentes de carbono alternativas a glucosa.

Agradecimiento. El presente proyecto es apoyado por los financiamientos del Fondo de Desarrollo Científico de Jalisco (FODECIJAL) para atender retos sociales 2022-Proyecto 10307, así como por el Tecnológico de Monterrey mediante los fondos OPEX y Apoyo a Tesis de Posgrado.

Bibliografía.

1. Morash, M. G., Soanes, K. H., Achenbach, J. C., & Ellis, L. D. (2022). *International journal of molecular sciences*. 23(14): 7985.
2. Suenaga, H., Koyama, Y., Miyakoshi, M., Miyazaki, R., Yano, H., Sota, M., Ohtsubo, Y., Tsuda, M., & Miyazaki, K. (2009). *The ISME journal*. 3(12): 1335–1348.
3. Adewale, P., Lang, A., Huang, F., Zhu, D., Sun, J., Ngadi, M., & Yang, T. C. (2021). *Scientific reports*. 11(1): 23982.

EL PAPEL DE LOS AMINOÁCIDOS CARGADOS EN LA SENSIBILIDAD ESTRUCTURAL DE UNA PROTEINA INTRINSECAMENTE DESORDENADA DE TARDÍGRADOS ANTE CHOQUE HIPEROSMÓTICO IN VIVO.

Gala Rocio López Herrera, Constanza Enriquez Toledo, César Ponce Diego, Cesar Luis Cuevas Velázquez, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, 316116587@quimica.unam.mx

Sensibilidad estructural, Proteínas intrínsecamente desordenadas, Estrés hiperosmótico

Introducción. La naturaleza desplegada de las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) provoca que su conformación sea particularmente susceptible a cambios en las propiedades del solvente. A la capacidad de modificar su conformación en respuesta a cambios en el entorno se le conoce como sensibilidad estructural. No todas las IDPs presentan los mismos niveles de sensibilidad estructural. Los cambios conformacionales que experimentan las IDPs se rigen por factores físicoquímicos codificados en su secuencia primaria, incluida su composición de aminoácidos y la disposición de residuos con carga opuesta dentro de la estructura primaria (1,2).

El objetivo del presente trabajo es estudiar la influencia del patrón de distribución de residuos cargados en la sensibilidad estructural de IDPs, utilizando como modelo una proteína de tardígrado que posee altos niveles de sensibilidad.

Metodología. Tomando como referencia la región linker de la IDP CAHS_D, miembro de las proteínas abundantes citosólicas solubles en calor de tardígrados. Se diseñaron variantes con alteraciones en la distribución de los residuos cargados. Las variantes de CAHS_D se expresaron en células de *Saccharomyces cerevisiae* y se realizaron ensayos donde se sometió a choques hiperosmóticos con NaCl o sorbitol. Para estimar la sensibilidad estructural a las diferentes concentraciones se realizarán ensayos basados en FRET (fenómeno de transferencia de energía de fluorescencia). Siendo definida la sensibilidad estructural como un Δ FRET, es decir la diferencia en el cociente FRET a 1.5 M y a 0 M de NaCl.

Resultados. La sensibilidad estructural se ve influenciada en gran medida por el patrón de los residuos cargados. Cambios en el valor de kappa, parámetro que cuantifica la distribución de los residuos cargados, impactan directamente en el nivel de sensibilidad estructural. Aun cuando se mantienen otros parámetros codificados en la secuencia como hidropatía o desorden, kappa es la propiedad que determina la sensibilidad de cada variante de CAS_D.

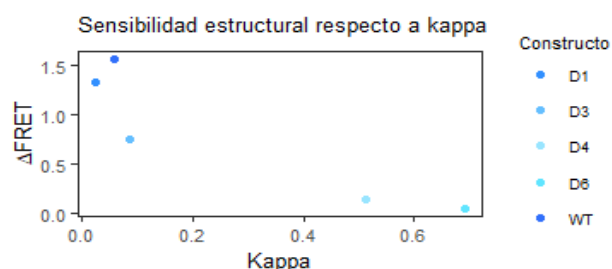


Fig. 1. Sensibilidad estructural de la región linker de CAHS_D y sus variantes ante choque hiperosmótico con NaCl.

Tabla 1. Parámetros de cada variante de CAHS_D obtenidos con CIDER (3).

| ID | Longitud | Kappa | FCR | NCPR | Desorden |
|----|----------|-------|------|-------|----------|
| WT | 105 | 0.06 | 0.52 | -0.01 | 0.82 |
| D1 | 104 | 0.03 | 0.52 | -0.02 | 0.82 |
| D3 | 105 | 0.09 | 0.39 | -0.05 | 0.78 |
| D4 | 105 | 0.51 | 0.50 | 0.04 | 0.79 |
| D6 | 105 | 0.69 | 0.52 | -0.01 | 0.82 |

Conclusiones. La distribución de los residuos cargados es una propiedad clave para la sensibilidad estructural de la proteína CAHS_D pues modificaciones en el valor de kappa conducen a cambios significativos en el nivel de sensibilidad. El patrón de cargas puede determinar un mecanismo mediante el cual ocurren los cambios conformacionales, favoreciéndolos o limitándolos, por lo que el estudio alrededor de esta propiedad aporta un mejor entendimiento del comportamiento de las IDPs.

Agradecimiento. Por su colaboración al laboratorio del Dr. Thomas C. Boothby del departamento de Biología Molecular de la Universidad de Wyoming.

Bibliografía.

1. Cuevas C, Velloso T, Guadalupe K, Schmidt H, Yu F, Moses D (2021). *Nat Commun* 12(1):1–12.
2. Bianchi G, Mangiagalli M, Barbiroli A, Longhi S, Grandori R, Santambrogio C (2022) *Biomolecules*, 12, 561.
3. Das R y Pappu R (2013). *PNAS* 110, 33, 13392 - 13397

INHIBICIÓN DE LA SHIKIMATO CINASA DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA POR DERIVADOS DE BENCIMIDAZOL. ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN SILICO*.

Lluvia Iveth Rios Soto ¹; Alfredo Téllez Valencia ¹; Claudia Avitia Domínguez ¹; Erick Sierra Campos²; Mónica Valdez Solana².

1. Facultad de Medicina y Nutrición, Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, Dgo, Mexico. Avenida Universidad s/n, Los Ángeles, 34076 Durango, Dgo., Mexico.
2. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango Campus Gómez Palacio, Avenida Artículo 123 S/N, Fracc. Filadelfia, Gómez Palacio 35010, México

claudia.avitia@ujed.mx

Palabras clave: Shikimato cinasa, SARM, diseño de fármacos

Introducción. Gracias a la aparición de cepas multirresistentes, las infecciones bacterianas se han convertido en una amenaza grave para la salud de la población a nivel mundial (1); se cree que para el año 2050 una de las principales causas de muerte se deberá a infecciones por bacterias multirresistentes; la Organización Mundial de la Salud ha reconocido al *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) como una amenaza importante con repercusiones globales, es causante de infecciones intrahospitalarias graves e infecciones adquiridas en la comunidad, por lo que el desarrollo de nuevos tratamientos contra ésta bacteria se torna prioritario. En este sentido, por su esencialidad para la supervivencia de la bacteria las enzimas de la ruta del shikimato son consideradas como excelentes blancos para el desarrollo de nuevos fármacos (2), dentro de ellas se encuentra la shikimato cinasa (SaSK), que cataliza la fosforilación del shikimato a shikimato-3-fosfato (3). Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo buscar y caracterizar cinética, biológica y toxicológicamente inhibidores de la SaSK.

Metodología. Para la identificación de inhibidores se utilizó una quimioteca formada por 161 compuestos derivados de bencimidazol, estos fueron ensayados a una concentración de 200 μ M en la SaSK (4). Posteriormente, se seleccionaron los dos compuestos más potentes para la caracterización cinética, mediante curvas a diferentes concentraciones de cada sustrato (ATP y shikimato) y concentraciones fijas de cada uno de los compuestos. A su vez, por el método de microdilución en placa, se obtuvo la CMI de los compuestos frente a una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (5). Por otro lado, se realizó una caracterización *in silico* de las propiedades ADME-Tox. Finalmente, por medio de dinámica molecular se observó el comportamiento de los compuestos frente a SaSK.

Resultados. De los 161 compuestos, 72 no inhibieron a la SaSK, 73 mostraron inhibición limitada que va del 5-20 %, 14 compuestos inhibieron 30-40 %, y dos de

ellos, el compuesto 1 y 7 mostraron una inhibición de SaSK del 56 y 52 % a 80 y 100 μ M respectivamente, resultando ser los más potentes. Por lo tanto, los compuestos 1 y 7 se caracterizaron cinéticamente para obtener su modo de inhibición. Los resultados mostraron que el compuesto 1 presenta una inhibición de tipo no competitivo con respecto a SHK y de tipo mixto con respecto a ATP. Por otro lado, el compuesto 7 presenta un comportamiento de tipo no competitivo con respecto a SHK y no competitivo con respecto a ATP. Los resultados de actividad biológica mostraron que la CMI del compuesto 1 y 7 en una cepa de SARM fue de 200 y 300 μ M respectivamente. La caracterización *in silico* de las propiedades ADME-Tox predijeron que los compuestos 1 y 7 poseen buenas características de absorción oral y una baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica. En los estudios de dinámica molecular se observó que el grado de compactación de la proteína se mantuvo durante toda la dinámica gracias a los análisis de RMSD, RMSF, radio de giro y área de superficie accesible al solvente, a su vez se observó la formación de puentes de hidrógeno con residuos importantes en la unión del ATP y del shikimato, manteniendo un promedio de entre 1 y 3 para el compuesto 1 y de entre 1 y 5 para el compuesto 7. Por lo tanto, estas interacciones forman un complejo estable con la SaSK, estabilizando sitios móviles dentro de la proteína. Conclusiones. Los inhibidores aquí reportados representan novedosos núcleos químicos capaces de inhibir a la SaSK, que pueden servir como guía para continuar con el diseño de un nuevo fármaco contra SARM.

Bibliografía.

1. Abushaheen MA, et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. (2020). *Dis Mon*; 66(6):100971.
2. Coggins JR, Abell C, et al. Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design. (2020). *Biochem Soc Trans*. 31:548-552.
3. Blanco B, Prado V, et al. *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase Inhibitors: Design and simulation studies

- of the catalytic turnover. (2013). *J. Am. Chem. Soc.*135:12366- 12376.
4. Favela-Candia, A. et al. Biochemical, Kinetic, and Computational Structural Characterization of Shikimate Kinase from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. (2019). *Mol Biotechnol.* Apr;61(4):274-285.
 5. Canton R, Garcia JE.Procedimientos en microbiología clínica. *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos en recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*; 2000. 35-39. (<http://www.seimc.org>).

DISEÑO Y EXPRESIÓN DE ANTICUERPOS BIESPECIFICOS CONTRA VARIANTES DE PREOCUPACIÓN DE SARS-COV-2

David Pascual-Galván, Vanessa Hernández-Rivera, Diva Sansanwal, Said Vázquez-Leyva, Mayra Pérez-Tapia, Martha Pedraza-Escalona*. Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioterapéuticos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México 11340, martha.pedraza@udibi.com.mx

Anticuerpos; Biespecíficos; SARS-CoV-2.

Introducción La pandemia por SARS-CoV-2 permitió el desarrollo de plataformas y tecnologías para poder controlar la contingencia sanitaria. Derivado de la naturaleza del material genético del virus (RNA sentido positivo), el cual tiene una tasa de mutación de 1×10^{-6} – 2×10^{-6} (1), que impacta de forma importante en el reconocimiento con el receptor celular ECA-2. Esto ha generado variantes de preocupación (VOC), con mutaciones en el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S y capaces de evadir la respuesta inmune celular y humoral. El uso de anticuerpos para el tratamiento contra COVID-19 ha sido eficiente, aunque algunos perdieron la capacidad de reconocer a las variantes con mayor número de mutaciones. Sin embargo, el diseño de anticuerpos biespecíficos provee una alta avidéz multivalente, mediante el reconocimiento a dos epítomos diferentes por parte de una misma molécula (2). El objetivo de este trabajo es la construcción y expresión de dos anticuerpos biespecíficos contra SARS-CoV-2, obtenidos a partir aquellos obtenidos de pacientes convalecientes y vacunados.

Metodología Se seleccionaron las células B plasmáticas productoras de anticuerpos contra RBD de SARS-CoV-2 mediante “sorting” por citometría de flujo y posteriormente las células fueron inmortalizadas con el EBV (3). La secuencia de las regiones variables de cadena sencilla y pesada de aquellos anticuerpos capaces de reconocer, con alta afinidad a RBD, fue determinada. La secuencia de dos anticuerpos (C y D) se tomó como molde para la construcción de los tándems VH1-VL1—VH2-VL2-Fc IgG y VH2-VL2—VH1-VL1-Fc IgG, utilizando el vector pFusse. Entre cada dominio se utilizaron linkers ricos en GS y entre cada anticuerpo un linker rico en Pro e Ala (4, 5). La expresión de estas construcciones se realizó en células Expi293F y las proteínas fueron purificadas por proteína A.

Resultados

Tabla 2. Analisis de línea germinal de los Anticuerpos C y D

| GEN | Anticuerpo C | | Anticuerpo D | |
|-----|--------------|-------------|--------------|-------------|
| | VL | VH | VL | VH |
| V | IGLV3-10*01 | IGHV3-72*01 | IGLV3-25*03 | IGHV6-1*02 |
| J | IGLJ2*01 | IGHJ4*01 | IGLJ2*01 | IGHJ4*02 |
| D | N/A | IGHD1-26*01 | N/A | IGHD3-22*01 |

Tabla 2. Constante de afinidad de los anticuerpos monoclonales humanos a las variantes de SARS-CoV-2 determinados mediante SPR

| Variante de Preocupación | Anticuerpo C | Anticuerpo D |
|--------------------------|--------------|--------------|
| RBD WT | 0.055 | 2.056 |
| RBD Beta | N/A | 0.018 |
| RBD Delta | N/A | 0.051 |
| RBD Delta Plus | N/A | 0.039 |
| RBD Omicron | N/A | 0.880 |
| RBD Omicron | N/A | 0.148 |

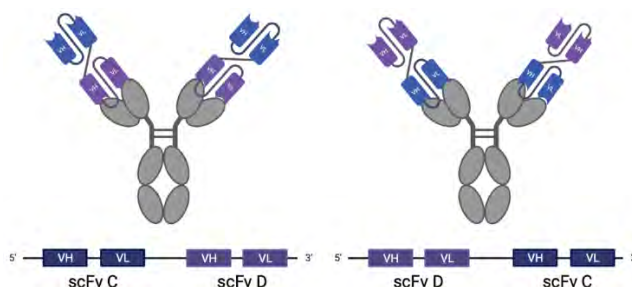


Fig. 1 Esquema de la construcción de anticuerpos biespecíficos contra SARS-CoV-2.

Conclusiones

La capacidad biológica de estas construcciones está siendo evaluada en este momento y será presentada durante el Congreso.

Bibliografía

- V. Markov, M. Ghafari, M. Beer, K. Lythgoe, P. Simmonds, N. Stilianakis & A. Katzourakis (2023) *Nature Reviews*, Vol. 21, 361-379.
- F. Labrijin, L. Janmaat, M. Reichert, I. Parren (2019) *Nature Reviews* Vol. 18, 585-608.
- E. Traggiai (2012) Immortalization of Human B Cells: Analysis of B Cell Repertoire and Production of Human Monoclonal Antibodies. En: *Antibody: Methods and Protocols*. G. Proetzi, H. Ebersbach, Humana Press, Londres 161-170
- M. Kipriyanov., (2012) Generation of Bispecific and Tandem Diabodies. En: *Antibody Phage Display*. M. O'Brien, R. Aitken, Humana Press. USA, 317-332
- N. Hornig, A. Färber-Schwarz, (2012) Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv En: *Antibody Engineering: Methods and Protocols* P. Chames. Humana Press. Londres, 713-727.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por el proyecto CONACyT 312900.

NATURAL HISTORY AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF ALDEHYDE DEHYDROGENASE SUPERFAMILY IN ARCHAEA

Danny G. Madrigal-Ceballos¹, Gabriel Moreno-Hagelsieb², Héctor Riveros-Rosas¹

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. CDMX. MÉXICO. ²Department of Biology, Wilfrid Laurier University, Waterloo, ON, CANADA. danny093@hotmail.com ; hriveros@unam.mx

Keywords: phylogenetic analysis, ALDH18, protein evolution, ALDH classification

Introduction. Aldehyde dehydrogenases (ALDHs) comprise one of the most ancient protein superfamilies, it contains a large number of isoenzymes that perform a large number of tasks that go from oxidative functions to non-catalytic functions [1]. Their members have been extensively studied in animals and plants, and their participation in diverse metabolic pathways, using a broad variety of aldehyde substrates, has been documented [2].

The ALDH superfamily has a wide phyletic distribution, being present in the three domains of life: Archaea, Bacteria and Eucarya. However, very few studies have been published characterizing ALDHs from archaea. In this work a phylogenetic analysis of archaeal ALDHs was performed to get insights into the diversity and evolution of this protein family.

Methods. We retrieved 1088 protein sequences using Blastp searches from 365 complete genomes from archaea available at NCBI's RefSeq database, plus 689 additional non-duplicated sequences using Hmmer. After that we performed multiple amino acid sequence alignments with ClustalX (<http://www.clustal.org/>), using as a guide a structural alignment constructed with VAST, that included 40 ALDH structures deposited at the Protein Data Bank. All retrieved information was captured in a local database made with the Microsoft Access program, to perform a variety of analyzes. Finally, phylogenetic analyses were performed with Mega 11 (<https://www.megasoftware.net/>).

Results. Using Blastp and Hmmer, we retrieved 1088 ALDH sequences from 365 complete genomes from archaea available at NCBI's RefSeq database. Of these genomes, 304 possess at least one *aldh* gene (average: 3.6 *aldhs*/genome). We found that ALDHs in archaea grouped into 34 protein families, the majority in the Euryarcheota phyla (Fig. 1). Indeed, *Haloterrigena turkmenica* DSM5511 possesses 20 *aldh* genes. More than half of these ALDH sequences belong to only six ALDH families: ALDH11, ALDH18, ALDH21, plus three unnamed ALDH families identified in the CDD protein database as cd07100, cd07097 and cd07131.

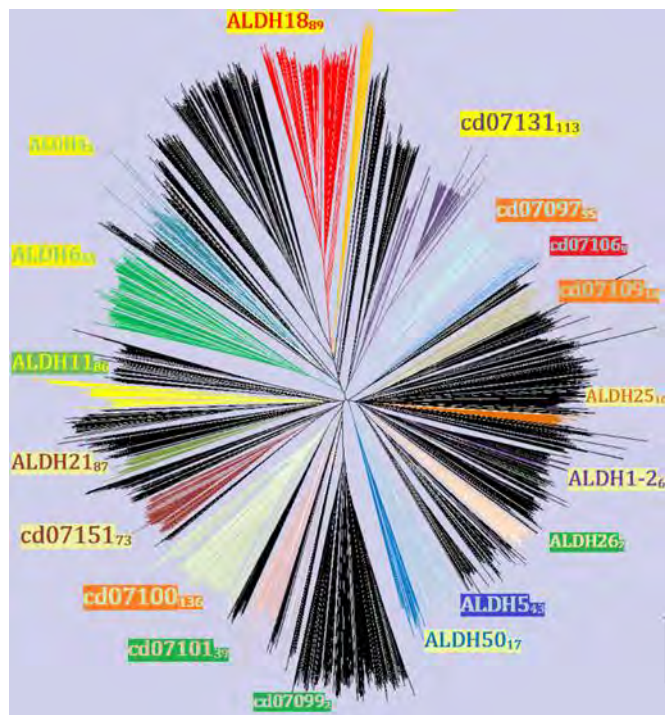


Fig. 1. Unrooted tree constructed with 1777 ALDH protein sequences retrieved from archaeal strains, plus 2630 representative ALDH protein sequences retrieved from Conserved domain database at NCBI. Identified ALDH families that contain ALDH sequences from archaea are indicated.

Conclusions. The broad phyletic distribution of ALDH18 (euryarcheota, bacteria and eucarya) suggests that this protein family could be among the most ancient within the ALDH superfamily.

Acknowledgements. Supported by UNAM-PAPIIT grant IN219022.

References.

1. Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A, Moreno-Hagelsieb G, Muñoz-Clares R. (2019). *Chem-Biol Interact.* 304: 83-87.
2. Riveros-Rosas H, González-Segura L, Julián-Sánchez A, Díaz-Sánchez AG, Muñoz-Clares RA. (2013). *Chem-Biol Interact* 202:51-61.

EL DOMINIO C-TERMINAL EXTRA QUE POSEE LA PIRUVATO CINASA DE THERMOPLASMA ACIDOPHILUM ESTABILIZA SU CONFORMACIÓN ACTIVA.

Evelyn Mejía-Núñez¹, Gloria Hernández-Alcántara¹, Jessica Díaz-Salazar², Alicia Vega -Segura¹, José J. García Trejo³, Carlos Guerrero-Mendiola¹, Guillermo Salcedo Barrientos¹ y Leticia Ramírez-Silva¹. ¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, ²Departamento de Físicoquímica, ³Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México 04510. lramirez@bq.unam.mx

Palabras clave: piruvato cinasa, Thermoplasma acidophilum, dominio C-terminal extra

Introducción. El análisis filogenético de la familia de la piruvato cinasa muestra un árbol dicotómico. Esta dicotomía sigue una estricta correlación con la dependencia de la actividad de la piruvato cinasa por K⁺: una rama corresponde a las secuencias de piruvato cinasas dependientes de K⁺ y la otra rama a las independientes de K⁺. Las ramas de las piruvato cinasas dependientes e independientes de K⁺ presentan una firma muy conservada T113/K114/E117/T120 y L113/Q114/K117/(L,I,V)120, respectivamente que covarían con la posición 117 de acuerdo a la numeración de la piruvato cinasa de músculo de conejo [1]. La piruvato cinasa de *Thermoplasma acidophilum* es una euriarchaeota termofílica que se encuentra en la rama de las independientes de K⁺, a pesar de presentar casi completa la firma de una enzima dependiente de K⁺ (L113/K114/E117/T120). Esta piruvato cinasa había sido purificada antes pero los autores no exploraron su dependencia por K⁺ [2].

Así pues, nos interesa estudiar si ésta piruvato cinasa constituía la primera enzima dependiente de K⁺ en la rama de las independientes de K⁺.

Metodología. Se mando a sintetizar el gen de la piruvato cinasa de *Thermoplasma acidophilum* (*ThaPK*) a Genescript y se clonó en pET-15b con colas de His₆ en el N-terminal.

Se purificó en una columna de Niquel His Trap FF con gradiente de imidazol. Se determinó la actividad en un ensayo acoplado a la lactato deshidrogenasa a 45°C. Se determinaron los patrones de velocidad inicial a concentraciones fijas variables de un sustrato y fijas del otro. Se determinaron los patrones de inhibición sin salida. Se hizo el modelado de homología de la *ThaPK* con base en la estructura de la piruvato cinasa de *Geobacillus stearothermophilus* usando MODELLER y validado por Verify-3D. Se realizó la construcción de la mutante *ThaPK* trunca (sin dominio C-terminal extra). Se obtuvieron los espectros de DC en el UV lejano y de CDB de 25 a 100 °C de la *ThaPK* y de la *ThaPK* trunca. Se hicieron geles BN-PAGE 1D y un gel SDS-PAGE 2D de la *ThaPK* silvestre y de la *ThaPK* trunca.

Resultados. La *ThaPK* es una enzima independiente de K⁺, no se activa por cationes monovalentes (Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, NH₄⁺, Cs⁺) ni a bajas concentraciones (0-10 mM) ni a altas concentraciones (10-100 mM). Tampoco presenta efecto activador por alguno de los efectores alostéricos clásicos (AMP, Fru1,6 BP, G6P, R5P y 3PG) de las PKs. Como la

mayoría de las PKs, sigue un mecanismo al azar en equilibrio rápido. Presenta una K_m por MgADP un orden de magnitud menor (0.02 mM) que la mayoría de las PKs (0.2-0.4 mM) y una Km por PEP (0.03 mM) similar a la de músculo de conejo (0.06 mM). Como no se conoce la estructura tridimensional de la *ThaPK*, se hizo un modelado de homología. El modelo estructural se construyó a partir de la PK de *Geobacillus stearothermophilus*. Así descubrimos que la *ThaPK*, posee un dominio C-terminal extra [3]. Este dominio es característico de enzimas que utilizan el motivo que une PEP: PDK, PEP sintasa, la enzima 1 de la fosfotransferasa de azúcares dependientes de PEP. En la PK, se ha propuesto que juega un papel en la estabilidad estructural de la PK a través de su interacción con el dominio A [4]. Con el objeto de entender el papel del dominio C-terminal extra de la *ThaPK* se construyó la mutante trunca. Se purificó y determinaron sus constantes cinéticas. Encontramos que la K_{0.5} por el MgADP y por el PEP es 10 y 100 veces mayor que la K_m de la enzima silvestre y posee una V_{max} de solo el 10% de la enzima silvestre. Los espectros de DC en el UV lejano de la enzima silvestre y de la mutante son muy parecidos; mientras que la entalpía aparente de la CDB de la mutante trunca es del 20% de la enzima silvestre con la misma T_{mapp}. (79°C). Con el objeto de descifrar el estado oligomérico de la *ThaPK* trunca se hicieron dos geles azules BN-PAGE del 4 al 18%. Uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie para definir el patrón de bandas y usar de referencia para cortar las bandas de interés del gel sin teñir y correr en una segunda dimensión en un gel SDS-PAGE al 12%. Esta segunda dimensión nos permitió identificar que las bandas que se observan con diferente peso molecular en el gel nativo son diferentes estados de oligomerización de la enzima trunca.

Conclusiones. La *ThaPK* es una enzima independiente de K⁺ constitutivamente activa que sigue una cinética de Michaelis-Menten, sigue un mecanismo al azar en equilibrio rápido, une con alta afinidad los sustratos y presenta un dominio C-terminal extra que estabiliza su estructura y conformación activa.

Agradecimiento. Donativo IN201021 a LRS de DGAPA.

Bibliografía.

1. Oria-Hernández, J., Riveros-Rosas, H., Ramírez-Silva, L. (2006) *J. Biol. Chem.* 281 (40): 30717-30724.
2. Potter, S. (1992) *FEMS Microbiol. Lett.* 93 (3): 235-239.
3. Susuki, K., Ito, S., Shimizu-Ibuka, A., Sakai, H (2008) *J. Biochem.* 144: 305-312.
4. Skai, H. (2004) *J. Biochem.* 136:471-476.

CARACTERIZACIÓN MECÁNICA-CUÁNTICA DEL DOMINIO DE UNIÓN AL RECEPTOR (RBD) DE LA PROTEÍNA SPIKE DE TIPO SALVAJE DEL SARS-CoV-2 ÚTIL PARA EL DESARROLLO DE NUEVAS BIOTECNOLOGÍAS.

***Juan Carlos Santiago-Jiménez**^a, Gabriel Ramírez-Damaso^a, Fray de Landa Alvarado-Castillo^a, Ricardo Godínez-Aguilar^b.

^a Escuela Superior de Física y Matemáticas, Instituto Politécnico Nacional. Edificio 9 de la Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Col. Lindavista, Alc. Gustavo A. Madero, Ciudad de México. C.P 07030. *lucasaji@gmail.com

^b Hospital Juárez de México, Laboratorio de Investigación en Inmunología. Av. Instituto Politécnico Nacional 5160, Magdalena de las Salinas, Gustavo A. Madero, Ciudad de México. CP 07760.
Palabras clave: SARS CoV-2, SPIKE-RBD-ACE2, TEORIA DFT.

Introducción. Investigaciones han reportado el mecanismo de acción de SARS CoV-2 en su infección, mediante el dominio de unión al receptor (por sus siglas en inglés Receptor Binding Domain: RBD) presente en la proteína Spike, que al interactuar con el receptor de la célula humana la enzima convertidora de angiotensina-2 (ACE2) promueve el ingreso del coronavirus a la célula epitelial del sistema respiratorio humano. Construimos un modelo cuántico de RBD de la proteína Spike de SARS CoV-2 tipo salvaje, usando técnicas de modelamiento y simulación molecular basadas en la mecánica cuántica y la teoría del funcional de la densidad (DFT).

Objetivo del trabajo. Construir y caracterizar un modelo mecánico-cuántico del RBD de la proteína Spike de SARS CoV-2 tipo salvaje, útil para estudios, investigaciones o desarrollo de nuevas biotecnologías.

Metodología. Siguiendo la secuencia de aminoácidos que lo constituyen depositadas en la base de datos de NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/YP_009724390.1)¹, también reportada por otros investigadores (<https://dx.doi.org/10.1021/acsnano.0c04798>)². El RBD está integrado por 51 aminoácidos, iniciando con la Leucina 455 y terminando con la Tirosina 505. Debido al papel crucial del RBD, en este trabajo se calcularon los índices de reactividad globales y locales para determinar los sitios y zonas de máxima reactividad del RBD con el fin de que sean útiles para investigaciones y desarrollo de nuevas estrategias que busquen inhibir sus efectos y disminuir o eliminar su unión al ACE2. El modelo atómico se construyó mediante la modelación y simulación computacional utilizando herramientas del software BIOVIA Materials Studio 2021³. La caracterización se abordó desde los niveles cuánticos de la materia, desde las interacciones y transición electrónicas de los átomos que constituyen a los aminoácidos del RBD.

Resultados. Modelamos y realizamos cálculos basados en la teoría del funcional de la densidad

(DFT), para obtener la estructura más estable de la molécula (Figura 1), los parámetros de convergencia de las variables en el proceso de optimización de la geometría fueron: energía 2.72×10^{-4} eV, gradiente 2×10^{-2} Å, desplazamiento 5×10^{-2} Å y desplazamiento máximo 0.3 Å. Obtuvimos propiedades electroquímicas como la afinidad electrónica, el potencial químico, la dureza química, el índice de electrofilia y el potencial de ionización. Las zonas de máxima reactividad de la molécula se obtuvieron mediante los orbitales moleculares de frontera HOMO-LUMO (Figura 1), mientras que los sitios más reactivos fueron determinados por índices de Fukui. También se obtuvieron la distribución de cargas eléctricas, el análisis poblacional de Mulliken para determinar áreas y sitios con exceso y déficit de electrones. Finalmente, se calcularon y analizaron los espectros Raman.

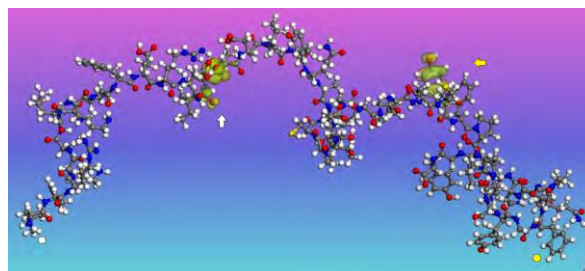


Fig. 1. Molécula estable del RBD Spike SARS-CoV-2, mostrando átomos: rojo-Oxígeno; gris-Carbono; blanco-Hidrógeno; azul-Nitrógeno; amarillo-S, azufre. De izquierda a derecha señala flecha blanca orbitales de frontera LUMO y flecha amarilla HOMO. Se distingue con círculos, blanco el inicio de la molécula con Leucina 455 y termina con Tirosina 505 círculo amarillo. Átomos totales 786.

Conclusiones. Se construyó y caracterizó un modelo mecánico-cuántico del RBD de Spike SARS CoV-2 tipo salvaje útil para futuras investigaciones.

Agradecimiento. Al Programa de Doctorado en Física de los Materiales-ESFM-IPN-Zacatenco, y a CONHACYT por la beca de doctorado 776574.

Bibliografía.

- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/YP_009724390.1
- <https://dx.doi.org/10.1021/acsnano.0c04798>
- <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/>

EL DOMINIO B COMO MONITOR DE CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LAS PIRUVATO CINASAS DE VIBRIO CHOLERAE

Gloria Hernández-Alcántara¹, Lilian González-Segura², Adela Rodríguez-Romero³, Alicia Vega-Segura¹, Leticia Ramírez-Silva¹. ¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. ³Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, UNAM. CDMX, c.p. 04510. ghernandez@bq.unam.mx

Palabras clave: Fluoróforos, potasio, cristalización

Introducción. *Vibrio cholerae* es una gammaproteobacteria que presenta en su genoma una gran duplicación de genes. Dentro de estas se encuentra la enzima piruvato cinasa (PK), que participa principalmente en la obtención de energía en la vía glucolítica. Una característica importante es que *V. cholerae* presenta 3 genes parálogos de PK (VcPK). Dentro de los cuales uno codifica para una PK dependiente de catión monovalente: VcIIPK con un E71 y dos para PKs independientes: VcIIPK con K75 y VcIIIPK con K71, aminoácido que determina la dependencia por el catión (1). Las PKs tienen en su estructura una tapa catalítica móvil, llamada dominio B, justo en la punta del dominio algunas PKs tienen un residuo de triptófano que las VcPKs no tienen. Este fluoróforo ha permitido en otras especies entender cambios en el sitio catalítico, sitio de unión del catión monovalente y su entorno al ser monitoreado por fluorescencia intrínseca. Estrategia que permitirá en este caso estudiar los sitios activos de las tres enzimas. Por lo que en este trabajo nos proponemos el siguiente objetivo: adicionar reporteros intrínsecos fluorescentes en la tapa catalítica de las tres VcPKs, así como conocer a nivel molecular la estructura tridimensional de las enzimas silvestres mediante su cristalización.

Metodología. Mediante mutagénesis dirigida obtener las mutantes de Y110W de VcIIPK, Y114W de VcIIPK y Y110W en VcIIIPK. Expresarlas en un sistema bacteriano y purificarlas mediante cromatografía de afinidad a níquel de acuerdo con lo reportado para las enzimas silvestres (1, 2). La cristalización se realiza mediante el método de difusión de vapor, mezclando volúmenes iguales de proteína y solución de reservorio, así como la presencia de los sustratos. Una vez obtenidos los cristales se difractan en un sincrotrón y los datos se integran con los programas XDS y CCP4. **Resultados.** Las tres mutantes se expresaron en la cepa BL21-AI a 25°C, se obtuvo un rendimiento en mg totales de 2.92, 7.32 y 19.76 para Y110W/VcIIPK, Y114W/VcIIPK y Y110W/VcIIIPK, respectivamente. Empezaremos con la caracterización bioquímica y estructural. En cuanto a la cristalización de las tres enzimas silvestre, hasta la fecha se ha logrado cristalizar la enzima VcIIIPK (Figura 1) los datos

cristalográficos se muestran en la tabla 1, hemos buscado mejorar la resolución sin mucho éxito. Para la enzima VcIIPK se han obtenido cristales, pero de baja calidad y para VcIIIPK no se han podido obtener cristales en alguna de las condiciones exploradas.

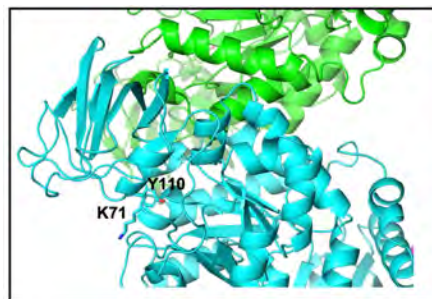


Fig. 1. Estructura cristalográfica de la enzima silvestre VcIIIPK. Se muestra el residuo Y110 del dominio B y el residuo K71 que da la dependencia por el catión monovalente.

Tabla 1. Datos cristalográficos de la enzima silvestre VcIIIPK

| | |
|-------------------|---------------------------|
| Grupo espacial | P6 ₄ 22 |
| Resolución | 3 Å |
| Unidad asimétrica | 2 subunidades |
| Conformación | abierta |
| Sustratos | Oxalato y Mg ⁺ |

Conclusiones. En la literatura sólo existe el reporte de tres estructuras cristalográficas de PK independientes de catión monovalente y se encuentran en presencia de potasio, la enzima VcIIIPK es un ejemplo de PK independiente de potasio y se cristalizó en ausencia de este catión monovalente y aunque se encuentra en conformación abierta nos permitirá realizar un análisis y comparación con las estructuras reportadas.

Agradecimiento. PPAPIIT-UNAM:IN205821 (GH-A). **Bibliografía.**

- Guerrero-Mendiola C, García-Trejo JJ, Encalada R, Saavedra E, Ramírez-Silva L. (2017) The contribution of two isozymes to the pyruvate kinase activity of *Vibrio cholerae*: one K⁺-dependent constitutively active and another K⁺-independent with essential allosteric activation. *PLoS One* 12(7):e0178673.
- Alba-Martínez, Z., Ramírez-Silva, L., Hernández-Alcántara, G. (2018) Exploring the differences between the three pyruvate kinase isozymes from *Vibrio cholerae* in a heterologous expression system. *BMC Research Notes*;11:527.

NUEVO SITIO ALOSTÉRICO EN LAS GlcN6P DESAMINASAS CON PLEGAMIENTO SIS

Jorge Marcos-Viquez¹, Annia Rodríguez-Hernández², Adela Rodríguez-Romero², Ismael Bustos-Jaimes¹.

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM; 2. Instituto de Química, UNAM. CDMX, C.P. 04510 ismaelb@unam.mx.

Palabras clave: Cooperatividad, Alostera, Cristalografía de rayos X, Calorimetría de Titulación Isotérmica.

Introducción. La GlcN6P desaminasa de *E. coli* (EcNagBI) es un sistema alostérico que se puede describir en términos generales con el modelo de dos estados cuaternarios de Monod, Wyman y Changeux (Calcagno y col. 1984). Presenta cooperatividad homotrópica positiva con respecto a la concentración de su sustrato, la GlcN6P, lo que se manifiesta en la forma sigmoide de las curvas de velocidad inicial de la reacción que cataliza. En presencia de GlcNAc6P, la enzima presenta activación heterotrópica que se manifiesta como un aumento en la afinidad por la GlcN6P. Los sitios de unión a ligantes en la proteína están termodinámicamente acoplados entre subunidades, y los cambios de afinidad van acompañados de una misma transición molecular. En el 2006 Yang y colaboradores reportan en *Shewanella oneidensis* una GlcN6P desaminasa con plegamiento SIS (SoNagBII), que además tiene activación alostérica por la GlcNAc6P. EcNagBI y SoNagBII representan un caso de convergencia evolutiva excepcional ya que no son homólogas ni comparten estructura terciaria, ni cuaternaria, y sin embargo tienen la misma función y responden alostéricamente a los mismos metabolitos.

Metodología.

Se caracterizó el mecanismo de cooperatividad de la GlcN6P desaminasa de *S. dentrificans* (SdNagBII), ortóloga de la de *S. oneidensis* (SoNagBII), por ensayos de cinética enzimática, calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y cristalografía de rayos X, usando dos ligantes: GlcNol6P, un inhibidor mixto; y GlcNAc6P, un activador alostérico.

Resultados. La caracterización cinética muestra curvas sigmoidales en ausencia de GlcNAc6P. El coeficiente de Hill (n_H) en ausencia de activador es 1.82 ± 0.14 (Tabla 1), lo cual implica que la cooperatividad se aproxima a la máxima posible para un dímero en los modelos de cooperatividad termodinámica clásica. El comportamiento de la enzima en la calorimetría de titulación isotérmica con GlcNAc6P muestra la existencia de dos sitios de unión

para GlcNAc6P por dímero, pero no hay una evidente cooperatividad positiva entre ellos. Cuando la enzima es previamente saturada con GlcNAc6P y posteriormente titulada con GlcNol6P se revela la estequiometría de dos moléculas por dímero, consecuentemente unidas a sitios distintos a los de unión de GlcNAc6P.

Se reportaron tres estructuras cristalográficas en el PDB: SdNagBII sin ligantes (PDB: 8EOL), SdNagBII en complejo con GlcNol6P (PDB:8FDB) y SdNagBII en complejo con GlcNol6P y GlcNAc6P (PDB:8EYM). Las estructuras en complejo con GlcNAc6P y GlcNol6P muestran la existencia de un nuevo sitio de unión en la intercara del dímero, no reportado previamente en proteínas homólogas. Este sitio está formado con residuos que no están conservados, por lo cual proponemos que es un sitio emergente en la evolución, que tiene un papel fundamental en la regulación alostérica de la enzima, tanto por la activación heterotrópica por GlcNAc6P como por la unión del GlcNol6P, que indica que el sustrato podría estar activando homotrópicamente desde este sitio.

Conclusiones.

En este proyecto, se describe un mecanismo de activación alostérica en SdNagBII que depende de la emergencia evolutiva de un sitio de unión no conservado y que aparentemente es una novedad evolutiva de algunas enzimas con plegamiento SIS. Este sitio activa a la enzima heterotrópicamente por GlcNAc6P y homotrópicamente por el sustrato, sin cambios conformacionales cuaternarios, solo por acomodos estructurales locales. La convergencia en función y regulación con EcNagBI remarca la ventaja adaptativa que estos mecanismos representan para el metabolismo de aminoazúcares.

Bibliografía.

1. Calcagno M.L., et al. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 787, 165-173.
2. Chen Y., et al (2006). *J. Biol. Chem.* 40, 29872-29885.
3. Marcos-Viquez J., et al. (2023). *Protein Sci.* 32(6): e4651.

PARTE I: MECANISMO QUE UTILIZAN LAS PIRUVATO CINASAS DE CRENARCHAEOTAS PARA ALCANZAR SU CONFORMACIÓN ACTIVA.

Alicia Vega-Segura, Guillermo Salcedo-Barrientos, Gloria Hernández-Alcántara y Leticia Ramírez-Silva. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM Ciudad de México 04510, malivega@hotmail.com

Palabras clave: piruvato cinasa, Thermophilum pendens, calorimetría diferencial de barrido

Introducción. En un trabajo previo de la piruvato cinasa hipertermófila de *Thermophilum pendens* (*TpPK*) se encontró baja movilidad de la bisagra y alta estabilidad del dominio B. Se propuso que se debe a la presencia de las interacciones Pi-Pi de los residuos aromáticos conservados presentes únicamente en este dominio o tapa catalítica de las Crenarchaeotas [1]. La presencia del núcleo hidrofóbico formado por estas fenilalaninas también explica la desnaturalización independiente de dominios; es decir la presencia de dos trazas en la calorimetría diferencial de barrido (CDB) observadas en la *TpPK*, mientras que las PKs de enzimas mesófilas tales como la de músculo de conejo, de *Vibrio cholerae* tipo I o de una Euriarchaeota termófila moderada de *Thermoplasma acidophilum* presentan una desnaturalización global; es decir una sola traza. Esta diferencia parece estar relacionada con el mecanismo que utilizan las Crenarchaeotas para alcanzar su conformación activa. Así pues, se pretende sustituir los residuos aromáticos del dominio B de *TpPK*, más del 90% conservados en todas las Crenarchaeotas, por los residuos alifáticos presentes en los animales, específicamente por los que se encuentran en la piruvato cinasa de músculo de conejo.

Metodología. Las diferentes mutantes se construyeron mediante el diseño y síntesis de oligonucleótidos mutagénicos utilizando el método de sobrelapamiento y extensión para las mutantes F89I y F89I/F108I/F109V; y por *QuikChange* para las mutantes F108I, F109V, F108I/F109V, F89I/F108I y F89I/F109V. Se corroboró la mutación mediante secuenciación. Las cepas utilizadas para la expresión de las mutantes fueron del sistema BL21. En este estudio se muestran los resultados de la mutante sencilla F89I y los avances de otras mutantes. La purificación de las proteínas se realiza mediante cromatografía de afinidad a níquel de acuerdo con el protocolo reportado para la enzima silvestre [1] con excepción del calentamiento a 80°C. La actividad se determina en un ensayo acoplado a la lactato deshidrogenasa a 45°C en ausencia de catión monovalente. Se han obtenido las constantes cinéticas de la mutante F89I

por PEP, MgADP y Mg^{2+}_{libre} , así como de los complejos con Mn^{2+} . También se obtuvieron los espectros de DC en el UV lejano y de CDB de 25 a 120 °C de la mutante F89I a diferentes velocidades de barrido y se compararon con los de la *TpPK* silvestre.

Resultados. Para encontrar la mejor condición de expresión de las mutantes se probaron 6 cepas del sistema BL21 y se monitorearon dos temperaturas de expresión. Para todas las mutantes confirmadas por secuenciación se obtuvieron las condiciones óptimas, excepto para la F89I/F108I/F109V en la que no se encontró proteína soluble en ninguna de las cepas. La mutante F89I se purificó y se determinaron sus constantes cinéticas. En presencia de Mg^{2+} , su V_{max} es la mitad de la enzima silvestre y su K para el MgADP y e Mg^{2+} son similares mientras que para PEP es 8 veces mayor. En cambio, con Mn^{2+} la V_{max} es cerca de 40% mayor y la K por PEP y MnADP es de 4 a 5 veces menor y por Mn^{2+}_{libre} 8 veces mayor que para la enzima silvestre. Los espectros de DC en UV lejano son similares para la mutante F89I y la *TpPK* silvestre. Con respecto a la CDB, la mutante F89I mantiene la desnaturalización independiente de dominios con 2 trazas calorimétricas: T_{mapp1} y T_{mapp2} de 101.18 °C y 107 °C, respectivamente; 3 °C y 2.28 °C mayores que las T_{mapps} respectivas de la *TpPK* silvestre.

Conclusiones. La mutante F89I presenta una mayor velocidad con Mn^{2+} que la enzima silvestre aunque su afinidad por el Mn^{2+}_{libre} es casi un orden de magnitud menor. La Phe 89 no es responsable de la alta estabilidad del dominio B de *TpPK* ya que en su ausencia se mantiene la desnaturalización independiente de dominios.

Agradecimiento. Donativo IN201021 a LRS de DGAPA.

Bibliografía. 1. De la Vega-Ruiz, Domínguez-Ramírez, L., Riveros-Rosas, H., Guerrero-Mendiola, C., Torres-Larios, A., García-Trejo, J., Ramírez-Silva, L. (2015) PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0119233

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A NOVEL UDP GLYCOSYLTRANSFERASE FROM *NICOTIANA TABACUM*

Arianna Duque-Ortiz, Guillermo Pastor-Palacios, Samuel Lara-González*

*División de Biología Molecular, Instituto Potosino de investigación Científica y Tecnológica A. C., Camino a la Presa de San José 2055, Lomas 4^a Secc, CP: 78216, San Luis Potosí, S.L.P., México

*Corresponding authors. E-mail addresses: samuel.lara@ipicyt.edu.mx

Palabras clave: UDP-Glucose, benzoic acids

Introduction: Glycosyltransferases (GTs) are essential enzymes found in all living organisms, playing crucial roles in catalyzing the transfer of sugar molecules to various acceptor molecules (1). In plants, GTs from the GT1 family, also known as UGTs, predominantly glycosylate secondary metabolites using uridine diphosphate (UDP) sugars (2). The GT1 family enzymes possess a GT-B fold comprising two Rossmann-like domains, with the catalytic site located at their interface. Specificity for sugar type acceptance is determined by conserved motifs, such as the PSPG motif at the C-terminal domain and the N5 loop in the N-terminal domain (3). GTs exhibit diverse functions in plants, participating in cell wall polysaccharide biosynthesis, modulation of germination, phytohormone inactivation, defense against pathogens, and controlling the bioactivity of toxic secondary metabolites (4). *N. tabacum*, with over 300 putative GTs in its proteome, holds great potential for biocatalysis and biotechnological interest.

In this study, we present the biochemical characterization of NtUGT89A2, a glycosyltransferase from *N. tabacum* that glycosylates dihydroxylated benzoic acid derivatives using UDP-glucose as a donor substrate.

Methodology: The NtUGT89A2 gene was cloned into a modified pET28 vector and expressed in *E. coli* cells.

The expressed protein was purified using affinity chromatography techniques, ion exchange chromatography, and size exclusion chromatography. Its purification was confirmed through Western Blot analysis. Thermal displacement assays were conducted to assess protein stability, and dynamic light scattering was employed to analyze protein aggregation.

Enzyme activity assays were performed to determine the catalytic function of the protein. Finally, HPLC-MS analysis was used to identify and quantify the reaction products.

These methodologies provided valuable insights into the biochemical characterization of the NtUGT89A2 glycosyltransferase and its substrate specificity.

Results:

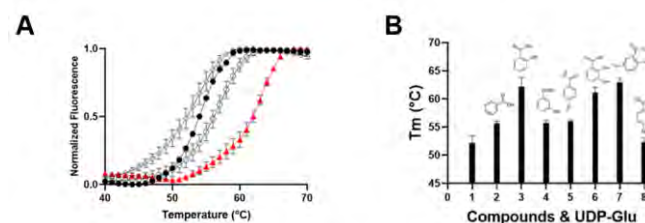


Figure 1: Thermal stability analysis of NtUGT89A2 in the presence of additives and ligands. **A)** Representative thermal denaturation curves of NtUGT89A2. **B)** Benzoic acid derivatives were evaluated as potential ligands in the presence of 5 mM UDP-glucose

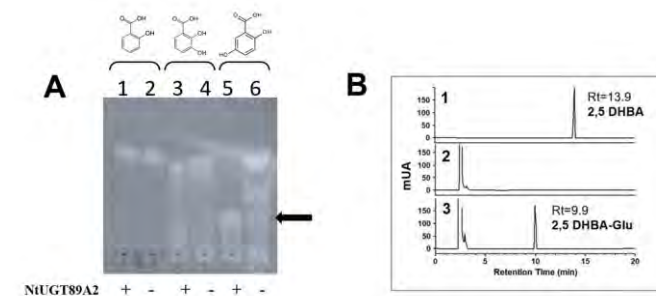


Figure 2: Glycosyltransferase activity of NtUGT89A2. **A)** Detection of 2 HBA, 2,3 DHBA and 2,5-DHBA glycosylation product by TLC. **B)** HPLC, analysis of the reaction mixture among 2,5-DHBA and UDP-glucose catalyzed by NtUGT89A2

Conclusiones. We successfully characterized the NtUGT89A2 enzyme from *N. tabacum*, which exhibited glycosyltransferase activity and a preference for 2,5-DHBA as the acceptor substrate. The enzyme displayed stability in the presence of specific ligands and demonstrated high purity after purification. These findings provide valuable insights for future studies on the functional and structural aspects of NtUGT89A2.

Agradecimiento. A CONACYT por la beca # 867402 otorgada a ADO

Bibliografía.

1. Paulson & Colley, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264 (30), 17615–17618.
2. Wang, *FEBS Lett.* **2009**, 583 (20), 3303–3309.
3. Louveau & Osbourn, *A. Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**, 11 (12), 1–22.
4. Chen & Li *Plant J.* **2017**, 89 (2), 195–203.

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN INHIBIDOR – CRISTALINA GAMMA S.

Kimberly Castañeda Gutierrez, Carlos Amero Tello. Universidad Autónoma del estado de Morelos. Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas. Centro de Investigaciones Químicas, Cuernavaca, Morelos México CP. 62209. Kimberly.castanedagut@uaem.edu.mx

Palabras clave: Cataratas, Cristalina Gamma S, Inhibidores

Introducción. Las cataratas han sido por años una de las principales causas de ceguera en el mundo (1). Esta patología se define como la opacidad parcial o total del cristalino que provoca gradualmente el deterioro de la visión (2). Las cataratas son causadas por la agregación de las proteínas presentes en el cristalino dentro de las que se encuentra la cristalina Gamma S (HgS) (3). Entre los factores de riesgo externos asociados a esta patología se encuentra la radiación UV a la cual estamos expuestos constantemente (4). Hasta el momento no existe algún tratamiento preventivo. En este trabajo estudiamos el efecto de la exposición a radiación UVB durante cortos periodos de tiempo y la capacidad de 5 moléculas para retrasar la agregación de HgS.

Metodología. La caracterización de la interacción entre la proteína y el inhibidor (melatonina, curcumina, epigalato, tetraciclina y rifampicina) se realizó mediante experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS) y calorimetría de titulación isotérmica (ITC). La proteína se utilizó a una concentración de 50 μ M. La proteína se irradia durante 2h y el inhibidor se colocó antes o después de la radiación según el caso. Para el experimento de fotoprotección se colocó el inhibidor en una cubeta por separado, en el paso de luz UV, en este caso la proteína fue irradiada durante 6 h.

Resultados. Los resultados de DLS muestran actividad inhibitoria de la rifampicina, tetraciclina, melatonina colocada después de irradiar 2h la proteína y la curcumina, epigalato y melatonina colocados antes de la radiación. Por otra parte, el ITC muestra que existe una interacción entre la rifampicina, tetraciclina y el epigalato con la proteína antes de ser irradiada. En el caso de la curcumina y la melatonina no se observó interacción, pero el DLS mostraba que existía un efecto inhibitorio por lo que el siguiente experimento consistió en colocar por separado la proteína y el inhibidor para ver si este en lugar de unirse tenía un efecto

fotoprotector, siendo el caso de la rifampicina, curcumina, melatonina y tetraciclina.

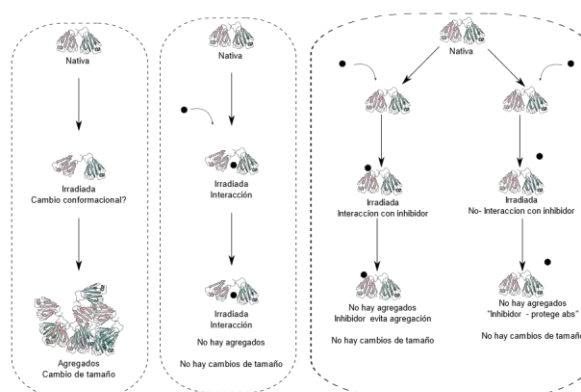


Fig. 1. Modelo del mecanismo de unión del inhibidor a la proteína HgS. A) HgS sin inhibidor; 2 h de radiación- 12 h de incubación a 37 °C, se forman agregados. B) HgS con inhibidor después de la irradiación; la molécula inhibidora se une a la conformación resultante de la proteína evitando la agregación. C) HgS con inhibidor añadido antes de la irradiación. Se muestran dos posibles escenarios. En el primer caso (izquierda) el inhibidor interactúa con la proteína nativa impidiendo el cambio conformacional. En el segundo caso (derecha), el inhibidor no interactúa con la proteína, pero absorbe la radiación.

Conclusiones. Distintas moléculas pueden retrasar la agregación de la HgS por distintos mecanismos: Interaccionando con la proteína nativa, interaccionando con alguna conformación intermedia, o simplemente absorbiendo radiación UVB.

Agradecimiento. Esta investigación fue financiada por CONAHCYT A1-S-11842.

Bibliografía.

1. Flaxman, S. R., et al., Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study (2017). *Lancet Glob Salud.* 5(12): 1221-1234
2. Nartey A. (2017) *Adv Ophthalmol Vis Syst* 6(3): 00178.
3. Kosinski-Collins M & Rey J. (2003) *Wiley Online Library Protein|Science* 12(3): 480-490
4. Cetinel S, et al.. (2017) *PLoS One* 12(5): 0177991

PARTE II: MECANISMO QUE UTILIZAN LAS PIRUVATO CINASAS DE CRENARCHAEOTAS PARA ALCANZAR SU CONFORMACIÓN ACTIVA.

Guillermo Salcedo-Barrientos, María Fernanda Jácome Alba, Alicia Vega-Segura, Gloria Hernández-Alcántara y Leticia Ramírez-Silva. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM Ciudad de México 04510, malivega@hotmail.com

Palabras clave: piruvato cinasa, *Pyrobaculum aerophilum*, calorimetría diferencial de barrido

Introducción: El análisis filogenético de la familia de la piruvato cinasa muestra un árbol dicotómico. Una rama pertenece a las piruvato cinasas dependientes de K^+ y la otra a las independientes de K^+ . Cerca del sitio de unión al K^+ , las ramas poseen una firma característica y diferente entre ellas. En la rama de las independientes de K^+ se encuentra un grupo de piruvato cinasas que pertenecen al subdominio de las Crenarchaeotas en el que no se conserva la secuencia consenso [1]. A este grupo pertenece la piruvato cinasa de *Thermophilum pendens* (*TpPK*) que en un estudio previo mostró baja movilidad de la bisagra que sube a la tapa catalítica y alta estabilidad de ésta. Se propuso que se debe a la presencia de las interacciones pi-pi de residuos aromáticos presentes únicamente en las tapas de las Crenarchaeotas. La presencia del núcleo hidrofóbico formado por estas fenilalaninas también explica la desnaturalización independiente de dominios; es decir la presencia de dos trazas en la calorimetría diferencial de barrido (CDB) observadas únicamente en la *TpPK* comparada con la desnaturalización global observada en piruvato cinasas de mesófilas. Así pues, en este estudio se pretende demostrar que estos residuos aromáticos son responsables de llevar a la *TpPK* a su conformación activa a través de sustituir las fenilalaninas por los residuos hidrofóbicos presentes en la piruvato cinasa de músculo de conejo y demostrar que este mecanismo es general para todas las Crenarchaeotas a través de comparar la desnaturalización térmica por CDB de la *TpPK* con la de la piruvato cinasa de *Pyrobaculum aerophilum* (*PaPK*) (Crenarchaeota hipertermofílica).

Metodología. En este trabajo se muestran los resultados obtenidos con la mutante sencilla F109V-*TpPK* y la caracterización de la *PaPK*. La mutante F109V-*TpPK* se construyó por *QuickChange*. El gen de *PaPK* se mandó a sintetizar a Gene Script en el vector de clonación pET15b con sitios de corte BamHI y NdeI, con el fin de transformar directamente en la cepa BL21GOLD(DE3) pLYsS. La purificación de la mutante y la *PaPK* se realizó mediante

cromatografía de afinidad a níquel de acuerdo con el protocolo reportado para la *TpPK* silvestre [1] con algunas modificaciones. Se obtuvo la desnaturalización térmica por CDB de la *PaPK* de 10 a 130°C y se obtendrá la de la mutante F109V. La actividad se determinará en un ensayo acoplado a la lactato deshidrogenasa a 45°C en ausencia de catión monovalente. Se obtendrán las constantes cinéticas de la mutante F109V-*TpPK* y de la *PaPK*, así como los espectros de DC en el UV cercano y lejano.

Resultados. Se obtuvieron las condiciones de expresión de la *PaPK* y de la mutante F109V-*TpPK*. Ambas enzimas se purificaron. Se determinó la desnaturalización térmica por CDB de la *PaPK* de 10 a 130°C a diferentes velocidades de barrido (30, 90, 120 y 150 °C). Al igual que en la *TpPK*, se observaron 2 transiciones calorimétricas con una $T_{mapp1}=108^{\circ}C$ y una $T_{mapp2}= 119.2^{\circ}C$. La primera y segunda transición es independiente y dependiente de la velocidad de barrido, respectivamente. Sin embargo, de acuerdo a las T_{mapp} la segunda traza de *TpPK* corresponde a la primera de la *PaPK* y viceversa. Este hallazgo se confirma por estudios de dinámica molecular que indican que el dominio más estable de *TpPK* es el B o tapa catalítica, mientras que en *PaPK* el dominio más estable es el C o sitio del efector alostérico. Por último, 3PG (efector alostérico de *PaPK*) incrementa la T_{mapp1} 4°C sin cambios en la segunda transición.

Conclusiones. La similitud en el patrón de desnaturalización térmica de *TpPK* y *PaPK* confirman que las Crenarchaeotas siguen un mecanismo general para alcanzar su conformación activa y el efector alostérico de *PaPK* todavía hace más estable su tapa catalítica.

Agradecimiento. Donativo IN201021 a LRS de DGAPA.

Bibliografía. 1. De la Vega-Ruiz, Domínguez-Ramírez, L., Riveros-Rosas, H., Guerrero-Mendiola, C., Torres-Larios, A., García-Trejo, J., Ramírez-Silva, L. (2015) PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0119233

STRUCTURAL THERMODYNAMICS OF BACTERIAL TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASES COMPLEXED WITH A TRANSITION-STATE ANALOG

A. Jessica Díaz-Salazar¹, Sergio Romero-Romero², Miguel Costas¹, D. Alejandro Fernández-Velasco³. ¹Laboratorio de Biofísicoquímica, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, UNAM, 04510 Ciudad de México, México. ²Department of Biochemistry, University of Bayreuth, 95447 Bayreuth, Germany. ³Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, 04510 Ciudad de México, México.
jessica.diaz@quimica.unam.mx

Keywords: Triosephosphate isomerase, protein-ligand binding, calorimetry.

Introduction. Triosephosphate isomerase (TIM; EC 5.3.1.1) catalyzes the interconversion between dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and D-glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) in the glycolytic pathway (1). All TIMs have the same catalytic residues (Lys12, His95, and Glu165 (Fig.1)) and possess a high affinity for the transition-state analog phosphoglycolohydroxamate (PGH) (2). Despite the structural identity of the catalytic site, PGH binding to the TIM from different species shows variations in the affinity constant. To set up the molecular determinants of these differences, our goal is to measure, by Isothermal Titration Calorimetry (ITC), the thermodynamic data that describe PGH binding to bacterial TIMs (K_A , ΔH , ΔS , and ΔC_p) and correlate these results with the 3D structures of apoTIM and in complex with PGH.

Methodology.

- Overexpression in *E. coli* and purification of all proteins to homogeneity (3).
- PGH prepared according to Weber *et al.* (4).
- Isothermal titration calorimetry (ITC) measurements by using a VP-ITC microcalorimeter (MicroCal) and TA affinity ITC unit. All experiments were performed at 25 °C, and for obtaining ΔC_p , the temperatures were 15, 20, 25, 30, and 35 °C.
- Co-crystallization of TIM-PGH complexes by vapor-diffusion hanging drop and data collection at LANEM-UNAM and BESSY-HZB.

Results

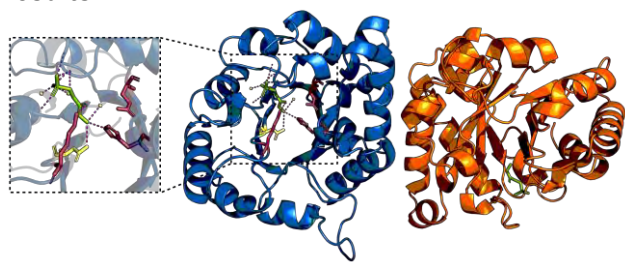


Fig. 1. Three-dimensional structure of GoTIM-PGH complex. Each monomer is shown in a different color. Active site residues are

shown in light red sticks. PGH (green sticks) binding mode is highlighted in the corresponding zoom (polar contacts are shown in magenta, and extra residues & structural waters participating in the binding mode are shown in yellow).

Table 1. Binding thermodynamic parameters for the interaction TIM-PGH at 25°C.

| TIM (mM) ^a | K_A (M ⁻¹) | ΔH (kJ/mol) | ΔC_p (J/Kmol) |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|
| DrTIM ^a | 5.6 E4 ± 2.3 E2 | -60.0 | t.b.d |
| NpTIM ^b | 2.7 E4 ± 4.7 E2 | -18.2 | t.b.d |
| GoTIM ^c | 2.1 E4 ± 2.4 E2 | -45.8 | t.b.d |
| CpTIM ^d | 6.8 E4 ± 7.9 E4 | -31.8 | -400.8 |
| ScTIM ^e | 4.9 E4 ± 0.1 E4 | -35.7 | -249.2 |
| TtTIM ^f | 5.3 E5 ± 2.6 E3 | -53.7 | t.b.d |
| BmeTIM ^g | 3.0 E4 ± 4.1 E2 | -39.4 | t.b.d |

Data were obtained using Affinimeter software and assuming a 1:1 binding mode.

^a *Deinococcus radiodurans*, ^b *Nostoc punctiforme*, ^c *Gemmata obscuriglobus*, ^d *Clostridium perfringens*, ^e *Streptomyces coelicolor*, ^f *Thermus thermophilus*, ^g *Brucella melitensis*, ^h protein concentration: 0.05-0.15 mM; K_A association constants; t.b.d: to be determined.

Conclusions. So far, the thermodynamic data obtained show striking differences in enthalpy ($\Delta\Delta H=41.8$ kJ/mol) and heat capacity ($\Delta\Delta C_p=152$ kJ/K mol), suggesting significant differences in protein-ligand interactions and solvation. The analysis of the corresponding structures will allow us to test these predictions.

Acknowledgments.

We acknowledge the financial support and allocation of beamtime by HZB and the beamline staff at BESSY for assistance, PAPIIT BV200322 and PAIP 5000-9018.

References.

- Olivares-Illana V, Riveros-Rosas H, Cabrera N, Tuena de Gómez-Puyou M, Pérez-Montfort R, Costas M, Gómez-Puyou A. (2017) *Proteins*. (85): 1190-1211.
- Alahuhta M, Wierenga RK. (2010) *Proteins*. (78): 1878-1888.
- Romero-Romero S, Costas M, Rodríguez-Romero A, Fernández-Velasco DA. (2015) *Phys.Chem.Chem. Phys.* (17): 20699-20714.
- Weber P, Fonvielle M, Therisod M. (2003) *Tetrahedron letters*. (44): 9047-9049

EL PRIMOSOMA MITOCONDRIAL DE ARABIDOPSIS

Antolin Peralta-Castro¹, Francisco Cordoba-Andrade¹, Corina Dfáz-Quezada¹, Luis G. Briebe¹, Langebio-Cinvestav , Irapuato 36600 luis.briebe@cinvestav.mx

Palabras clave: replisoma, proteína-proteína, iniciador

Introducción. Los mecanismos y la regulación de la replicación del ADN en los organelos vegetales se desconocen en gran medida, ya que se han estudiado bioquímicamente pocas proteínas implicadas en el ensamblaje de replisomas¹. Una primasa-helicasa denominada Twinkle (proteína similar a T7 gp4 con localización de nucleóide intramitocondrial) desdobra el ADN en mitocondrias y organelos vegetales. Twinkle en las plantas es una enzima bifuncional con un módulo de primasa activo. Esto contrasta con el Twinkle animal en el que el módulo primasa está inactivo^{2,3}. La primasa-helicasa organelar de *Arabidopsis thaliana* (AtTwinkle) alberga un módulo de primasa (AtPrimase) que consta de un dominio de ARN polimerasa (RPD) y un dominio de dedo de Zn⁺⁺ (ZFD)^{2,3}.

Metodología. Las reacciones de primasa contenían 100 µM de los NTP indicados y 10 µCi de [α -³²P]-NTP (3000 Ci/mM). Los productos de la reacción se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 27% que contenía urea 3 M. Las reacciones de primasa se analizaron mediante imágenes de fósforo. Las reacciones de primasa se llevaron a cabo utilizando 5 µM de la plantilla sintética y 0.5 µM de cada AtPrimasa-helicasa recombinante.

Resultados. Para estudiar el posible papel de la ZFD en el reconocimiento de templados, realizamos un análisis funcional de los aminoácidos que posiblemente estén involucrados en el reconocimiento de plantillas y utilizamos experimentos de intercambio de subdominios entre los dedos Zn⁺⁺ de T7 y primasas de *Arabidopsis*. Nuestros resultados son congruentes con la existencia de un replisoma similar a T7 en las mitocondrias de las plantas que dirige la replicación del ADN mitocondrial y la formación de un primosoma tipo T7 para iniciar la síntesis del ADN mitocondrial. Aquí, investigamos los mecanismos por los cuales AtTwinkle reconoce su secuencia molde y cómo se produce la síntesis de iniciadores y el acoplamiento a las ADN polimerasas organelares. Los datos bioquímicos muestran que la ZFD del módulo AtPrimase es responsable del reconocimiento de la plantilla, y este reconocimiento se logra mediante los residuos N163, R166 y K168. El papel de la ZFD en el reconocimiento de templados también se corroboró intercambiando las

RPD del bacteriófago T7 primasa y AtPrimasa con sus respectivas ZFD. Una primasa quimérica que alberga la ZFD de la primasa T7 y la RPD de AtPrimasa sintetiza ribonucleótidos a partir de la secuencia de reconocimiento de primasa T7 y, a la inversa, una primasa quimérica que alberga la ZFD de AtPrimasa y la RPD de primasa T7 sintetiza ribonucleótidos a partir de la secuencia de reconocimiento de AtPrimasa. Una quimera que alberga los RPD del bacteriófago T7 y el ZBD de AtTwinkle sintetiza eficientemente iniciadores para la ADN polimerasa organelar vegetal.

Conclusiones. Concluimos que el ZFD es responsable de reconocer una secuencia templada y de la transferencia del iniciador/primer al sitio activo de las ADN polimerasas organelares. La actividad primasa de la planta Twinkle es consistente con reconstrucciones basadas en la filogenia que concluyeron que el último ancestro común eucariota (LECA) de Twinkle era una enzima con actividades primasa y helicasa. En las plantas, el dominio primasa está activo, mientras que en los metazoos la actividad primasa se pierde. Nuestros datos respaldan la idea de que AtTwinkle sintetiza iniciadores en la cadena retrasada de acuerdo un replisoma mitocondrial en plantas que presenta diversos orígenes evolutivos⁴.

Agradecimientos. Agradecemos a Ciencia de Fronteras-CONACHYT # 70713 y a la Organización de Estados Iberoamericanos.

Bibliografía.

1. Kulczyk AW, Richardson CC: The Replication System of Bacteriophage T7. *Enzymes* 2016, 39:89-136
2. Morley SA, Peralta-Castro A, Briebe LG, Miller J, Ong KL, Ridge PG, Oliphant A, Aldous S, Nielsen BL: *Arabidopsis thaliana* organelles mimic the T7 phage DNA replisome with specific interactions between Twinkle protein and DNA polymerases Pol1A and Pol1B. *BMC Plant Biol* 2019, 19(1):241.
3. Peralta-Castro A, Baruch-Torres N, Briebe LG: Plant organelar DNA primase-helicase synthesizes RNA primers for organelar DNA polymerases using a unique recognition sequence. *Nucleic Acids Res* 2017, 45(18):10764-10774.2. Apellido e inicial del nombre de cada coautor, separados por comas. (Año) Título del capítulo. En: *título en letra cursiva*. Apellido del Editor e inicial del nombre. Editorial, País de edición, pág-pág.
4. Briebe LG: Structure-Function Analysis Reveals the Singularity of Plant Mitochondrial DNA Replication Components: A Mosaic and Redundant System. *Plants (Basel)* 2019, 8(12)..

Diseño computacional de péptidos estructurados: resultados preliminares

Yan C. Leyva Labrada y Carlos A. Brizuela, Departamento de Ciencias de la Computación, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada 22860, México, lyan@cicese.edu.mx, cbrizuel@cicese.mx

Palabras clave: *Diseño Computacional*, *Péptidos Estructurados*, *Algoritmos*

Introducción. Las proteínas desempeñan un papel esencial en casi todas las funciones estructurales, catalíticas, sensoriales y reguladoras presentes en los sistemas vivos (1). A lo largo de millones de años, los procesos evolutivos naturales han dado forma y creado proteínas con estructuras y funciones innovadoras, resultando de gran interés para la medicina, la biología sintética, las nanotecnologías y las biotecnologías (2). Debido a su importancia, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en diseñar proteínas que cumplan funciones específicas para propósitos también específicos (3). Esta rama de investigación, conocida como ingeniería de proteínas o diseño de proteínas (4), ha generado un campo fascinante y prometedor en la biotecnología y la bioingeniería.

El objetivo de este trabajo es determinar la secuencia de aminoácidos que, al plegarse, genere una estructura tridimensional cuyas coordenadas cartesianas del backbone presentan alta similitud con las coordenadas dadas de un molde dado, empleando para ello un algoritmo evolutivo.

Metodología. Se desarrolla un algoritmo evolutivo basado en la Estimación de Distribución (EDA por sus siglas en inglés), en el cual un miembro de la población se representa mediante las distribuciones de aminoácidos en cada posición de la secuencia. En el algoritmo, se establece la configuración tridimensional de las secuencias utilizando el API de ESMFold. Además, en la función de evaluación de aptitud, se incorporan tanto el valor RMSD como el índice GDT debido a la relevancia de la información proporcionada por cada uno de estos parámetros. Mediante la utilización de la métrica de divergencia de Kullback-Leibler, se emplea un filtro para elegir un subconjunto de secuencias a las cuales se les evaluará su idoneidad.

Resultados. El algoritmo se ejecutó con parámetros notablemente reducidos debido a la alta demanda de recursos computacionales. Se apreció una destacada semejanza visual entre las estructuras predichas y la estructura original, especialmente evidente al contrastar las estructuras secundarias. A pesar de esto, las secuencias de aminoácidos de los péptidos diseñados difieren significativamente respecto a las secuencias de referencia.

Los valores de aptitud obtenidos se sitúan considerablemente por debajo del valor máximo teórico alcanzable. En todos los escenarios, se lograron obtener representaciones cuyas conformaciones energéticas son inferiores a las de la proteína de referencia. Además, para todos los casos el diseño con el mayor valor de aptitud no siempre exhibe la menor energía conformacional.

La Figura 1 ejemplifica un diseño generado a través del algoritmo. En este caso, se trabajó con una población de 15 individuos evolucionados por 80 generaciones. En la parte A, se presenta el péptido de referencia (1psv del PDB), que consiste en 28 aminoácidos con la secuencia **KPYTARIKGRFTSNEKELRDFLETFTGR**. En contraste, en la parte B, se exhibe el péptido diseñado con la secuencia **TSVTVATGRVSTGSAQLALSALALGAD**. La aptitud alcanzada fue de 33.04, en comparación con un valor máximo teórico de 224. Esto resultó en un coeficiente de aproximación de 0.15 y un valor de RMSD de 3.30Å.

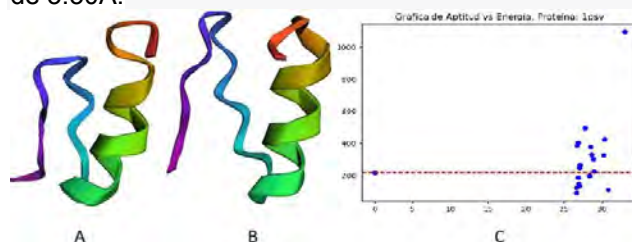


Fig. 1. A-Péptido de referencia, B-Péptido diseñado de mayor valor de aptitud, C-Gráfica de aptitud (abscisas) vs energía (ordenadas) de los 20 mejores diseños.

Conclusiones. El algoritmo evolutivo tipo EDA fue capaz de diseñar péptidos con estructuras parecidas al molde de entrada dado.

Bibliografía.

- (1). R. L. BALDWIN, "Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding" by A. Fersht. 1999. New York: Freeman. 631 pp. \$67.95 (hardcover). "Protein Science," vol. 9, pp. 207-207, Dec 2000.
- (2). J. Pleiss, "Protein design in metabolic engineering and synthetic biology," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, pp. 611-617, October 2011.
- (3). J. L. Foo, C. B. Ching, M. W. Chang, and S. S. J. Leong, "The imminent role of protein engineering in synthetic biology," *Biotechnology Advances*, vol. 30, pp. 541-549, May 2012.
- (4). D. N. Woolfson, "A brief history of de novo protein design: minimal, rational, and computational," *Journal of Molecular Biology*, vol. 433, no. 20, p. 167160, 2021.

EMPLEO DE ESMFOLD EN UN ALGORITMO GENÉTICO PARA EL DISEÑO DE UNA PROTEÍNA A PARTIR DE UN ESQUELETO POLIPEPTÍDICO DETERMINADO

Carlos A. Oliva Moreno y Carlos A. Brizuela, Departamento de Ciencias de la Computación, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Ensenada 22860, México, carlosalberto@cicese.edu.mx

Palabras clave: *Diseño de proteínas, Algoritmo genético*

Introducción. El diseño de proteínas consiste en lo siguiente: dada la descripción de la estructura de una proteína, encontrar la secuencia de aminoácidos que se pliega en dicha estructura como su conformación nativa¹. Métodos computacionales y no computacionales de diseño de proteínas se han utilizado para desarrollar proteínas con diversas aplicaciones biotecnológicas². Por otro lado, recientemente se propuso un método de Inteligencia Artificial, denominado ESMFold, para predecir la conformación nativa en que se plegará una secuencia de aminoácidos determinada³. En este trabajo se desarrolló un algoritmo genético⁴ que internamente emplea ESMFold para diseñar una secuencia de aminoácidos a partir de las coordenadas espaciales de un esqueleto polipeptídico determinado.

Metodología. Se desarrollaron dos variantes (denominadas A y B) de un mismo algoritmo genético simple (SGA), cuyos parámetros se describen en la Tabla 1. El objetivo de ambos algoritmos es encontrar la secuencia de aminoácidos que maximiza el GDT⁵ obtenido tras superponer las coordenadas espaciales del esqueleto polipeptídico predicho por ESMFold para dicha secuencia contra el esqueleto de la proteína objetivo, que en este caso se trata de PDB ID 8HJC. El algoritmo A se ejecutó 20 veces, cada una partiendo de una población de 30 secuencias aleatorias. Luego, se ejecutó el algoritmo B partiendo de la colección de las 20 mejores soluciones encontradas por el algoritmo A.

Tabla 1. Parámetros del algoritmo genético simple. Se implementaron dos variantes: A y B.

| Representación | Secuencias de aminoácidos |
|--------------------------------------|--|
| Función de aptitud | GDT (átomos N, C α , C y O) |
| Distancias <i>cutoff</i> para el GDT | 1, 2, 4 y 8 Å |
| Algoritmo predictivo | ESMFold |
| Tamaño de la población | (A) 30 secuencias (B) 20 secuencias |
| Selección | Por torneo (A) $k = 4$ (B) $k = 2$ |
| Recombinación | Uniform crossover ($p = 0.65$) |
| Mutación | Random resetting ($p = 0.1$) |
| Probabilidad de mutación | 0.35 |
| Reemplazo | Generacional con elitismo |
| Condiciones de paro | (A) 30 generaciones (B) 50 generaciones |

A

CLESGTSCIPGAQHNCCSGVCVPIVTIFYGVCY
ANKGQGHPCCTVDTKCDWDACECANRWGRGFCI

B

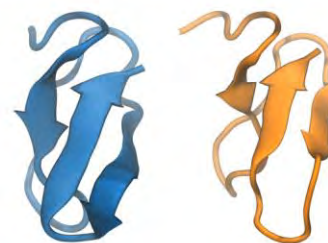


Figura 1. Comparación de la secuencia y la estructura de la proteína objetivo (azul) y la proteína diseñada (naranja).

Resultados. El algoritmo encontró la secuencia mostrada en la Figura 1A, cuya conformación nativa (predicha por ESMFold) es aquella mostrada en la Figura 1B. El GDT para esta solución fue 66.09, y el RMSD fue 6.47 Å. Cabe mencionar que el GDT y el RMSD de la predicción de ESMFold para la secuencia real son 84.28 y 1.96 Å, respectivamente.

Conclusiones. Se demostró que los métodos de IA para la predicción de la estructura de una proteína también pueden aplicarse de manera factible al diseño de proteínas. Los resultados preliminares obtenidos son alentadores; a pesar de la simplicidad de esta metodología, fue posible encontrar una secuencia que se pliega en una estructura similar a la proteína objetivo.

Bibliografía.

- (1) Huang, P., Boyken, S., & Baker, D. (2016). *Nature*, 537(7620), 320-327.
- (2) Khoury, G. Smadbeck, J., Kieslich, C., & Floudas, C. (2014). *Trends Biotechnol.*, 32(2), 99-109.
- (3) Lin, Z., Akin, H., Rao, R., ..., Rives, A. (2023). *Science*, 379(6637), 1123-1130.
- (4) Katoch, S., Chauhan, S., & Kumar, V. (2021). *Multimed. Tools Appl.*, 80(5), 8091-8126.
- (5) Zemla, A. (2003). *Nucleic Acids Res.*, 31(13), 3370-3374.

PROMISCUIDAD BI-SUSTRATO DE LA ISOMERASA FOSFORIBOSIL ANTRANILATO (PriA) EN UN CONTEXTO DE MODELOS METABÓLICO-MATEMÁTICOS A ESCALA GENÓMICA

Naxhie López-Reyes^a, Francisco Barona-Gómez^b, Martin Heil^c, Roberto Olivares-Hernández^d

^aUnidad de Genómica Avanzada LANGEBIO, CINVESTAV-IPN, Irapuato, GTO. CP 36821.

^bInstitute of Biology, Leiden University, Leiden, NL. 2311

^cDepartamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, Irapuato, GTO. CP 36821

^dDepartamento de Procesos y Tecnología, División de Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM-Cuajimalpa, CDMX. CP.05348

naxhie.lopez@cinvestav.mx

Promiscuidad Enzimática, Evolución de Proteínas, Metabolismo Subterráneo

Introducción. La isomerasa fosforribosil antranilato (PriA), tiene una estructura de barril de ocho subunidades $\beta/\alpha^{(1)}$ (también denominada TIM), es una enzima promiscua, ya que isomeriza dos sustratos diferentes en el mismo sitio catalítico por lo que es crucial en las rutas de biosíntesis de L-Histidina (His) y L-Triptófano (Trp), está ampliamente distribuida en el *phylum* Actinobacteria. Los episodios evolutivos de sub-especialización en una de estas funciones están documentados en la familia de enzimas PriA. Por estas razones, PriA es considerada una enzima modelo para el estudio de la evolución enzimática.

En el presente trabajo se lleva a cabo un análisis del efecto de la promiscuidad enzimática al utilizar Modelos Metabólicos a Escala Genómica (GSMM) de tres actinobacterias. Con esta aproximación fue posible valorar cuál es su repercusión, llegando a conclusiones a nivel de biología de sistemas del *metabolismo subterráneo*⁽²⁾ (metabolismo que hace uso de enzimas promiscuas con reacciones secundarias) en especial en los subsistemas de biosíntesis de L-aminoácidos.

Metodología. Se llevó a cabo el cálculo de la distribución de flujos metabólicos utilizando el análisis de balance de flujo (FBA⁽³⁾) junto con un análisis de sensibilidad de flujos relativos como lo es el análisis de *robustez*⁽⁴⁾ el cual permite calcular y visualizar como cambia el flujo de un objetivo de interés (e.g. reacción involucrada en PriA) a medida que el flujo a través de una reacción específica de interés (e.g. segunda reacción de PriA) varía en magnitud; para los cálculos se utilizó la herramienta COBRA Toolbox 3.0 en MATLAB⁽⁵⁾ y GSMM previamente reportados de actinobacterias modelo que contienen a PriA y una subespecializada, además de otros análisis.

Resultados. Los flujos de biosíntesis de His mostraron ser mayores en comparación con los flujos de biosíntesis de Trp, en las actinobacterias seleccionadas (**Fig.1**). En los análisis de robustez se observó un comportamiento inversamente proporcional cuando se variaron en magnitud los flujos de síntesis de las dos reacciones involucradas en la promiscuidad de PriA (**Fig. 2**).

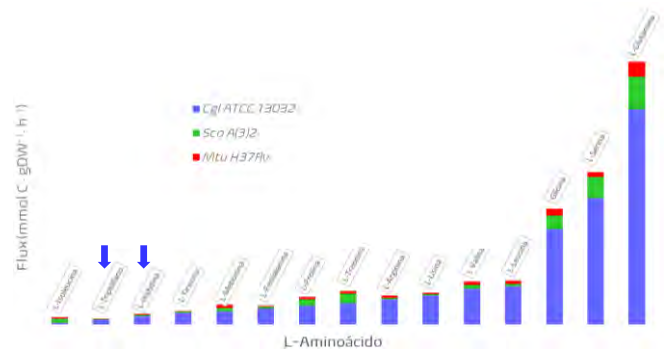


Fig. 1. Fluxómica comparativa de las rutas de biosíntesis de L-aminoácidos.

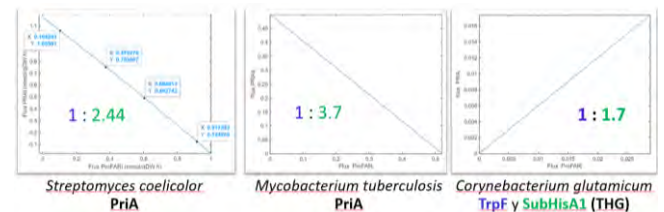


Fig. 2. Análisis de *robustez* de las reacciones PRAi vs ProFARi

Conclusiones. Es posible evaluar la promiscuidad enzimática por medio de GSMM. La capacidad para predecir el comportamiento depende de la anotación funcional que incluya la promiscuidad durante la construcción de GSMM de calidad.

Agradecimiento. Beca del PNPC, CONAHCYT No. 772069

Bibliografía.

- 1) Due A., Kuper J., Geerltof A., von Kries J., Wilmanns M. (2011). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:3554-3559.
- 2) D'Ari R., Casadesús J. (1998). *Bioessays.* 20(2):181-186.
- 3) Orth J., Thiele I., Palsson B.(2010). *Nat. Biotechnol.*28(3):245-248.
- 4) Edwards J., Palsson B.(2000). *Biotechnol. Prog.* 16(6):927-939.
- 5) Heirendt L., Arreckx S., Pfau T., Mendoza S., Richelle A., Heinken A., Haraldsdottir H., Wachowiak J., Keating S., Vlasov V. (2019). *Nat Protoc.*14(3):639-702.

ANÁLISIS DE MECANISMOS MOLECULARES DE LA TERMOESTABILIDAD DE LA HISTONA rHMfA POR DINÁMICA MOLECULAR

Juan José de Jesús Gómez Castro, Salomón J. Alas Guardado
Departamento de Ciencias Naturales, UAM Cuajimalpa, Ciudad de México 05300.
juan.gomez@cua.uam.mx

Palabras clave: histona rHMfA, estabilidad térmica, puentes salinos

Introducción. La dinámica y la estabilidad son estados energéticos que han impulsado la variabilidad y evolución de la vida a través de mecanismos biológicos y fisicoquímicos que protegen al ADN. Las proteínas histonas han permitido esto mediante la compactación del genoma (1) proporcionándole estabilidad ante ambientes fisicoquímicos dañinos, permitiendo el surgimiento de nuevas familias de genes (2). La histona rHMfA fue la primera histona arqueal descubierta (Figura 1), sin embargo, a pesar de proceder un organismo termófilo, *Methanothermus fervidus*, en estado monomérico es incapaz de mantener su estabilidad conformacional en el intervalo de temperatura óptima de crecimiento y a temperaturas inferiores (3). Por ello, se realizó un análisis de la estabilidad térmica del homodímero (rHMfA)₂ utilizando dinámica molecular (MD), para identificar cuáles son los mecanismos estructurales y moleculares involucrados en la estabilidad de esta proteína.

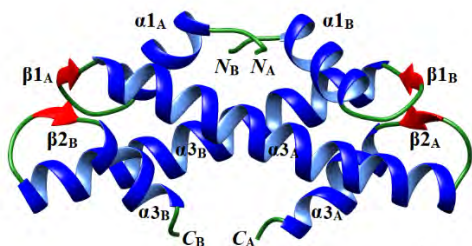


Fig. 1. Estructura terciaria del homodímero (rHMfA) de *M. fervidus*. La proteína está compuesta por dos monómeros, las cadenas A y B. Cada cadena está formada por tres α -hélices y dos loops, cada loop contienen una lámina β .

Metodología. Las simulaciones de MD se realizaron por triplicado a cinco diferentes temperaturas durante un lapso de 1 μ s. El paquete computacional empleado fue GROMACS v2020.3 (4) y el campo de fuerza AMBER99SB con el modelo de agua explícito SPC/E y la neutralización a pH = 7.0 se realizó con NaCl. Se dividió el dímero en sus dos monómeros, la “cadena A” y “cadena B” obteniendo en total 3 sistemas a analizar y que se compararon con el monómero B aislado. Los análisis estructurales y de las interacciones moleculares realizados fueron:

desviación de la raíz cuadrática media, radio de giro, perfiles de estructura secundaria, puentes de hidrógeno, área superficial accesible al solvente polar y no polar y puentes salinos.

Resultados. En este análisis se encontró que la estabilidad térmica del dímero se mantiene a pesar del aumento de temperatura, lo cual no ocurre con el monómero. Esta estabilidad se debe principalmente a la formación de puentes de hidrógeno y de redes salinas (triadas y tétradas) en la interfase de (rHMfA)₂ que mantienen al núcleo hidrófobo unido y compacto. Aunque, la temperatura aumenta los puentes salinos se mantienen estables, incluso se forman nuevas conexiones entre los residuos para formar otras redes salinas. Estas interacciones son más estables en las estructuras hélices α 2 de ambas cadenas, es decir, las cadenas que están involucradas en la formación del núcleo hidrófobo. Esto indica que estas interacciones son esenciales para mantener la termoestabilidad del dímero.

Conclusiones. Los resultados muestran que la estabilidad térmica del dímero (rHMfA)₂ se debe a la formación de interacciones moleculares en la interfase entre las dos cadenas A y B. Estas interacciones son de tipo puentes de hidrógeno y en especial puentes salinos, que conforme aumenta la temperatura aumentan su frecuencia y su formación.

Agradecimiento. Se agradece el apoyo otorgado por CONAHCYT a través del proyecto A1-S-46202.

Bibliografía.

1. Laursen, S.P., Bowerman, S., Luger, K. (2021). Archaea: The final frontier of chromatin. *J. Mol. Biol.* 433(6), 166791.
2. Brunk, C.F., Martin, W.F. (2019). Archaeal histone contributions to the origin of eukaryotes. *Trends in Microbiol.* 27(8), 703–714.
3. Ponce, M. (2022). Estudio de la estabilidad estructural y térmica de la proteína histona rHMfA de la arquea termófila *Methanothermus fervidus* por dinámica molecular. [Proyecto de Servicio Social: Estudios teóricos y experimentales de moléculas con actividad en sistemas biológicos, Departamento de Ciencias Naturales, UAM Cuajimalpa].
4. Abraham, M.J., *et al.* (2015). High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25.

VIII Congreso de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas



Estudio del acoplamiento molecular de ligando-receptor, de ficocianobilina con receptores que participan en el mantenimiento de la hipertensión arterial

Plácido Rojas Franco, Margarita Franco Colín, Cinthya Sotelo Yerenia, Vanessa Blas Valdivia, Erick García Pliego, Edgar Cano Europa.

Palabras clave: Hipertensión, ficocinobilina, nutraceuticos, acoplamiento molecular

Introducción

En México, más de 30 millones de personas padecen hipertensión, lo que significa que una de cada cuatro personas padece esta condición. Actualmente los medicamentos antihipertensivos incluyen diuréticos, beta-bloqueantes. Sin embargo a pesar de todos estos avances, asociados a la disponibilidad de fármacos de comprobada eficacia y alta aceptabilidad, a ello debe agregarse el aumento progresivo de las tasas de prevalencia, estimándose en más de un billón el número de hipertensos a nivel mundial. El reconocimiento de nuevos compuestos naturales ha dado paso al estudio de otras alternativas farmacológicas. Uno de ellos la ficocianobilina el cual es un cromóforo de tetrapirrol lineal de cadena abierta que se obtiene a partir de la C-ficocinina de *Espirulina maxima*. En este artículo, se expondrá la interacción ligando-receptor a través de acoplamiento molecular Docking de ficocianobilina y receptores involucrados en la hipertensión.

Metodología

Se realizó un estudio de acoplamiento molecular dirigido entre la ficocianobilina y los receptores ATR1, ATR2 ETR tipo1, ETR tipo2 y MAS receptor. Todos los archivos fueron preparados, agregando átomos de hidrogeno, cargas Kollman y cargas Gasteiger. Se aplicó un algoritmo híbrido Lamarckiano. Se realizaron un total de 100 pruebas de acoplamiento y para todas las simulaciones posteriores se adoptó la conformación de menor energía (8 kcal/mol). Se utilizaron las herramientas Autodock 1.5.7 y Discovery Studio Client 2021.

Resultados

Tabla 1. Contactos estimados entre la ficocianobilina, medicamentos que participan en el control de la presión arterial alta y el receptor ATR1, AT2R, ETR tipo 1, ETR tipo 2 y MAS.

| Receptor | Ligando | ΔG Kcal/mol | Interacciones no covalentes |
|----------------------|-----------------|---------------------|---|
| ATR1 (4ZUD) | Olmesartan | -6.86 | *Ile31, Tyr35, Trp84, Tyr87, Ser105, Val108, Ser109, Arg167, Cys180, Pro285, Ile288, Tyr292 |
| | Ficocianobilina | -7.24 | *Val108, Leu112, Tyr113, Val116, Arg167, Lys199, Asn200, Trp253, His256, Gln257, Ile288 |
| ATR2 (5XJM) | C21 | -5.52 | *Trp100, Tyr108, Tyr103, Leu124, Arg182, Ile187, Ala194, Met197, Pro301 |
| | Ficocianobilina | -6.58 | *Trp100, Tyr108, Leu124, Met128, Arg182, Ile187, Leu190, Ala194, Cys195, Ile196, Lys215, Ile304 |
| ETR1 (8HCQ) | Ambisertan | -4.72 | =Gln72, Lys74, Tyr231, Arg232 |
| | Ficocianobilina | -7.46 | =Asn67, Tyr68, Cys69, Glu230, Tyr231, Cys341 |
| ETR2 (5GLI, 5GLH) | Ficocianobilina | -7.99 | *Pro88, Lys97, Met245, Ile254, Cys255, Leu256, Leu257, Pro259, Lys273 |
| | Ficocianobilina | -8.77 | *Ile157, Lys161, Trp167, Val177, Pro178, Phe240, Leu252, Ile254, Cys255, Leu256, Lys273, Lys346 |
| Mas1 12826 | Ficocianobilina | -8.16 | *Ile227, Val231, Ile235, Ala274, Ile278, Phe281, Val282, Ser284, Lys286, Arg289 |

*Puente de Hidrogeno, *Puente H-C, *Enlace pi-H, pi-cation, pi-sulfuro, pi-sigma, pi-pi, *Enlace alquilo, pi-alquilo

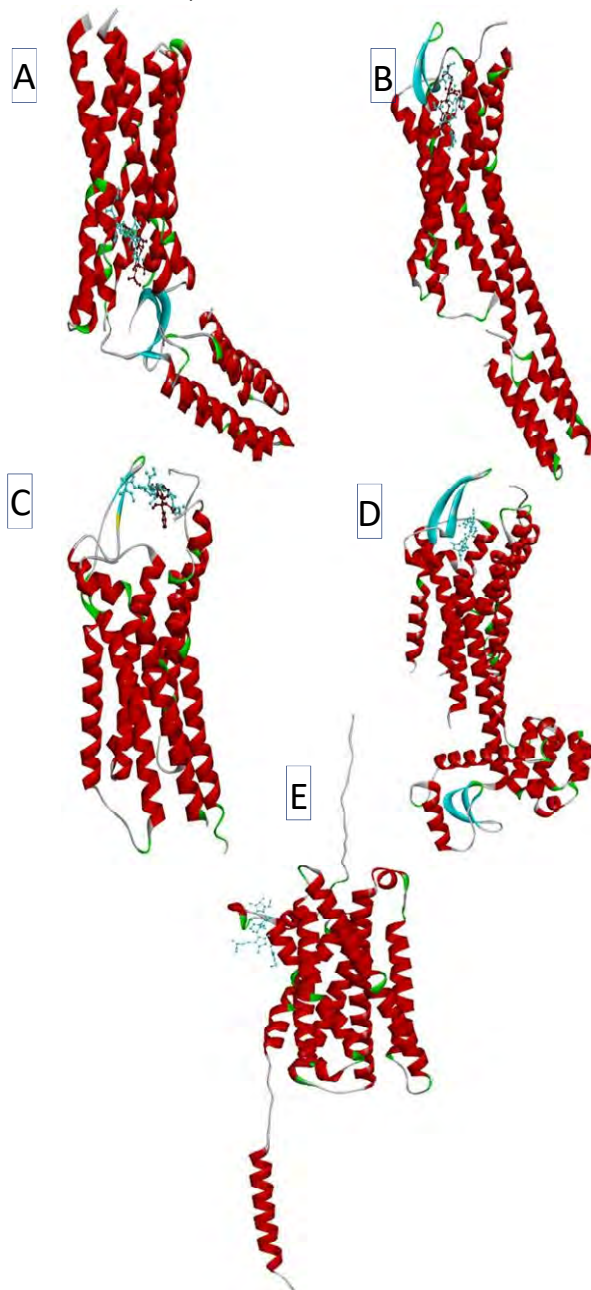


Figura 1 Acoplamiento ligando-receptor de la ficocianobilina, antagonista y agonistas de los receptores A) AT1, B) AT2, C) ET1, D) ET2 y E) MAS.

Conclusión

La simulación por acoplamiento molecular mostro una alta afinidad de ficocianobilina con los sitios activos de los receptores AT1, AT2, ET1, ET2 y MAS, por lo que se podría considerar como una alternativa en el tratamiento de la hipertensión.

Agradecimiento

Proyecto SIP-IPN 20230995, 20231024 y 20231029

Bibliografía

Rojas-Franco P, García-Pliego E, Vite-Aquino AG, Franco-Colín M, Serrano-Contreras JI, Paniagua-Castro N, Gallardo-Casas CA, Blas-Valdivia Vanessa, Cano-Europa E. 2022. *NUT*, 14:1464
Memije-Lazaro I.N., Blas-Valdivia V., Franco-Colín M., Cano-Europa E. 2018. *J. Funct. Foods*; 43:37–43.
Paredes-Carbajal M.C., Torres-Durán P.V., Díaz-Zagoya J.C., Mascher D., Juárez-Oropeza M.A. 2001. *J. Ethnopharmacol.*; 75:37–44.

Inmunoreactividad a IgE de la arginina cinasa del cangrejo café *Callinectes bellicosus*

Alonso Alexis López-Zavala¹, Haydeé A. Brassea-Estardante¹, Oliviert Martínez-Cruz¹, Karina D. Garía-Orozco² y Adrián Ochoa-Leyva³

¹Universidad de Sonora. Hermosillo, 83180. alexis.lopez@unison.mx; ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, 83304; ³Instituto de Biotecnología-UNAM. Cuernavaca, 62210.

Palabras clave: arginina cinasa, IgE, epítomos

Introducción. En los últimos años se ha registrado un aumento en la prevalencia de reacciones alérgicas ante el contacto o consumo de crustáceos, ocasionando la activación de respuestas inmunológicas mediadas por anticuerpos IgE (1). La arginina cinasa (AK) es considerada como uno de los principales alérgenos presentes en crustáceos (2). Actualmente, no se ha estudiado el potencial alergénico de la jaiba café (*Callinectes bellicosus*); el cual es un producto de importancia económica a nivel nacional e internacional.

El objetivo de este trabajo fue determinar la inmunoreactividad a IgE de la AK de *C. bellicosus* (CbAK).

Metodología. La CbAK se purificó a partir del músculo de la *C. bellicosus* por precipitación fraccionada con sulfato de amonio a un al 60% y 90% de saturación, seguido de una cromatografía de intercambio iónico (Q-sepharosa). La pureza de la proteína se determinó mediante SDS-PAGE(3). La identificación de la proteína se realizó por espectrometría de masas. La inmunoreactividad a IgE de la CbAK, tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes, se evaluó mediante ensayos de western blot utilizando sueros de pacientes alérgicos al consumo del cangrejo.

Resultados. Se logró purificar una banda de un peso molecular de ~40 kDa la cual fue identificada por LC-MS (Fig. 1). Las secuencias de la CbAK presente una alta indentidad respecto a otras Aks de crustáceos. Se evaluó la inmunoreactividad a IgE de la AK en condiciones nativas y desnaturalizantes utilizando sueros de pacientes alérgicos, obteniendo un 70 y 80 % de reacciones positivas de los sueros evaluados, respectivamente. Lo que sugiere la exposición de epítomos localizados hacia el interior de la estructura de la CbAK.

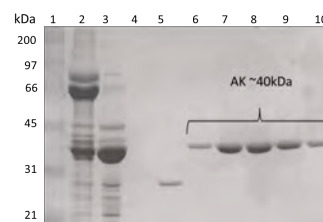


Fig. 1. SDS-PAGE de la purificación de la CbAK. Carril 1, MWM; 2, Clarificado; 3, precipitado 90% (NH₄)₂ SO₄; 6-9, CbAK.

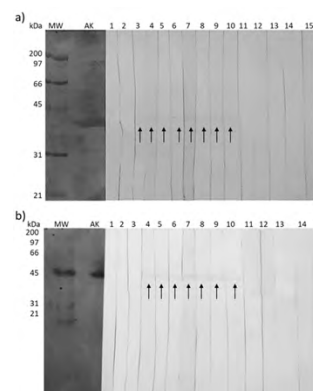


Fig. 2. Inmunoreactividad a IgE de la CbAK en condiciones nativas (a) y desnaturalizantes.

Conclusiones. La CbAK presente inmunoreactividad a IgE presentes en suero de personas alérgicas al consumo de *C. bellicosus*. Por lo que podría ser una de proteína relacionada con el desarrollo de alergias en personas susceptibles a este alimento.

Agradecimientos. Al financiamientos otorgado por la UNISON mediante el proyecto USO313008866 y al programa de intercambio académico UNAM/UNISON-2023.

Bibliografía.

1. Lopata AL, Kleine-Tebbe J, Kamath SD. (2016). *Allergo Journal*, 25(7), 24-32.
2. Ruethers T, Taki AC, Johnston EB, Nugraha R, Le TT, Kalic T, McLean TR, Kamath SD, Lopata AL. (2018). *Seafood allergy: Mol Immunol.*, 100:28-57.
3. Laemmli UK. (1970). *Nature*, 227(5259), 680.

IMPACTO DE LA COOPERATIVIDAD ENTRE LOS DOMINIOS REGULATORIOS SH Y EL DOMINIO CATALÍTICO TK DE LA TIROSINA CINASA ABL EN SU ESTABILIDAD ESTRUCTURAL Y SU CAPACIDAD DE RECONOCER LIGANDOS FARMACOLÓGICOS

Enrique García Hernández; José Alberto Escobar Cázares; Alan David Juárez Barragán.
Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Departamento de Biomacromoléculas. Ciudad de México, 04510. jalberto230396@gmail.com

Tirosina cinasa Abl; estabilidad estructural; parámetros termodinámicos.

Introducción. Abl es una tirosina cinasa que cataliza la transferencia del fosfato- γ del MgATP a una proteína objetivo, participando en cascadas de señalización celular, principalmente en la regulación del crecimiento celular (1). Su sobre expresión está involucrada con la leucemia mieloide crónica (LMC), y es ocasionada por la fusión con la proteína Bcr, desregulando su capacidad de autoinhibirse. Actualmente, se han desarrollado diversos fármacos para tratar la LMC de manera exitosa, como Imatinib y Dasatinib, que se unen al sitio activo, impidiendo la unión de ATP; sin embargo, se han observado mutaciones en el sitio activo que le confieren resistencia (2). Recientemente, se ha descrito a detalle su mecanismo de regulación, lo que permite enfocar la atención en sitios de regulación alostérica; no obstante, poco se ha indagado en la afinidad termodinámica de unión, lo que aumentaría la eficacia del fármaco.

En este trabajo, se estudia la estabilidad estructural de Abl, así como su interacción con fármacos, para obtener sus parámetros termodinámicos.

Metodología. Se siguió el protocolo según Seeliger (3) con algunas modificaciones. Brevemente, se cultivaron células *E. coli* BL21 con el plásmido de Abl, co-transformada con YopH. Fueron lisadas con sonicación, y la proteína fue purificada con columna de afinidad a níquel, y por intercambio iónico. Las muestras fueron concentradas y analizadas mediante dicroísmo circular (DC), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

Resultados. Se trabajó con el constructo SH3-SH2-TK de Abl, y se llevó a DC para realizar barrido de temperatura de 20 a 90°C, y se añadieron SDS y ácido mirístico, al igual que en DSC. En ITC, se añadió Imatinib o Dasatinib para obtener sus constantes de afinidad.

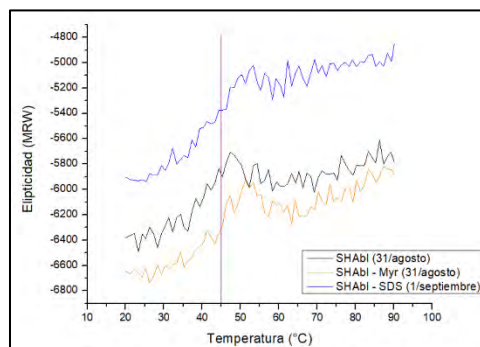


Fig. 1. Barridos de Temperatura de DC de SH-Abl sola (negra), SH-Abl-Myr (naranja) y SH-Abl-SDS (azul).

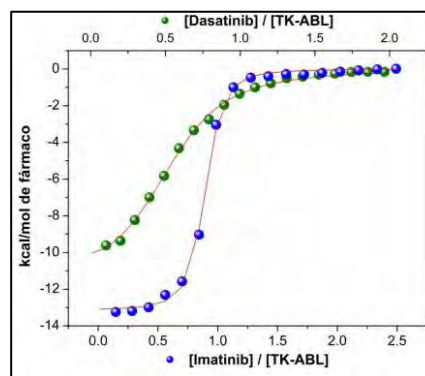


Fig. 2. Titulación en ITC de SH-Abl con Imatinib (azul) y Dasatinib (verde).

Conclusiones. La presencia de inhibidores alostéricos, como Myr y SDS, parece afectar sutilmente la estabilidad estructural de SH-Abl, modificando la T_m en 2°C. Además, TK-Abl muestra mayor afinidad por Imatinib de la que presenta este dominio con los dominios regulatorios, SH-Abl, resaltando la importancia de los dominios regulatorios.

Agradecimiento. Apoyo beca Conahcyt

Bibliografía.

1. Laneville, P. (1995). *Seminars in immunology*, Vol. 7:255-266.
2. Nagar, Bhushan, y otros. (2003). *Cell*, Vol. 112:859-871.
3. Seeliger, Markus, y otros. (2005). *Protein Science*. Vol. 14: 3135-3139.

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS CONTRA LA PROTEÍNA ANTI APOPTÓTICA BCL-2 MEDIANTE ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Luis A. Caro-Gómez^{1,2}, Claudia G. Benítez-Cardoza¹, Marisol López-Hidalgo¹.

¹.Laboratorio de Bioquímica y Biofísica Computacional, ENMH-IPN, CDMX, México. ².Tecnológico de Estudios Superiores de Huixquilucan, Mex, México.

E-mail lcarog1200@alumno.ipn.mx

Palabras clave: Proteína Bcl-2; Regulación de Apoptosis; Acoplamiento Molecular

Introducción.

La apoptosis es un proceso natural necesario para la eliminación de células potencialmente peligrosas o en senescencia. La desregulación de la apoptosis se ha implicado en una variedad de enfermedades humanas como el cáncer. Este proceso está regulado por varias proteínas, entre ellas las que pertenecen a la familia Bcl-2. Los miembros de esta familia se agrupan, según su participación en la vía mitocondrial apoptótica, en proteínas pro y anti apoptóticas. La proteína anti-apoptótica Bcl-2 está formada por 4 dominios BH, un dominio transmembranal (TM) que le permite anclarse a la membrana externa mitocondrial y una región intrínsecamente desordenada conocida como "flexible loop domain" (FLD), así como un surco de unión BH3, mediante el cual interactúa con otros miembros de la familia [1,2].

Metodología.

A partir de dos estructuras 3-D de la proteína Bcl-2 (estructura inicial y estructura centroide obtenida del análisis de agrupamiento de una trayectoria de simulación de dinámica molecular), se eligieron dos sitios de unión en la superficie de la proteína Bcl-2 (sitio 1: surco de unión BH3, sitio 2: FLD; Figura 1), para evaluar por simulaciones de acoplamiento molecular todos los compuestos de la librería (HLL-460) de la empresa Enamine, utilizando el software MOE.

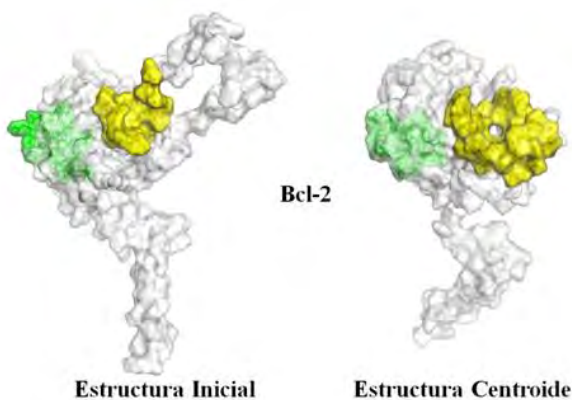


Figura 1. Sitios de unión potenciales en las estructuras 3-D de la proteína Bcl-2. Sitio I (verde), Sitio II (amarillo).

Resultados.

De los compuestos que mostraron un valor de ΔG más negativo con respecto a los fármacos de referencia Venetoclax y Taxol (-9.07 y -6.97 Kcal/mol respectivamente), se seleccionaron 10 moléculas que se acoplaron a alguno o a ambos sitios de unión en la superficie de la proteína Bcl-2 como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de ΔG de los compuestos seleccionados.

| Compuesto | Estructura | Sitio | Docking Score \pm DE | Interacción Estérica | Puente hidrógeno |
|------------|------------|-------|------------------------|--|------------------|
| 1 | Inicial | 1 | -11.73 \pm 0.63 | Y108, D111, E114, M115, Q118, V133, E136, L137, D140, R146, F153 | R139 |
| | Centroide | 2 | -11.44 \pm 0.46 | Y9, R12, E13, M16, K17, H20, G33, D34, V35, G36, A37, I48, F49, S50, Q73, T74, A76, P99, D171 | |
| 2 | Centroide | 2 | -10.82 \pm 0.61 | E13, D34, V35, G36, A37, G47, I48, F49, S50, P65, V66, A67, R68, T69, Q73, T74, A76 | K17 |
| 3 | Inicial | 1 | -11.27 \pm 0.62 | Y108, E114, M115, Q118, E136, L137, R139, D140, F153 | D111, R146 |
| | Centroide | 1 | -10.59 \pm 0.59 | F104, Y108, R110, F112, M115, E136, L137, D140, G145, R146, A149 | D111 |
| 4 | Inicial | 1 | -10.72 \pm 0.68 | Y108, R110, D111, E114, Q118, V133, E136, L137, D140, N143, G145, R146, F153 | M115, R139 |
| | Centroide | 2 | -11.15 \pm 1.05 | R12, E13, M16, H20, G33, D34, V35, G36, I48, F49, S50, R68, Q73, T74, D171 | K17 |
| 5 | Centroide | 2 | -11.81 \pm 0.42 | Y9, E13, M16, H20, G33, D34, V35, I48, S50, Q73, T74, P90, D171 | R12, K17 |
| | Inicial | 2 | -10.80 \pm 0.65 | Y9, V15, M16, G33, D34, A37, A38, A174, L175 | R12, D171 |
| 6 | Centroide | 2 | -12.37 \pm 0.46 | R12, E13, M16, G33, D34, V35, G36, A37, I48, S50, T74, P90 | K17, Q73 |
| | Centroide | 1 | -11.50 \pm 0.40 | F104, Y108, R110, N143, G145, Y202 | R107, R146 |
| 8 | Centroide | 2 | -11.85 \pm 0.56 | R12, E13, M16, G33, D34, V35, G36, A37, I48, F49, S50, V66, R68, Q73, T74, A76 | K17 |
| 9 | Centroide | 2 | -11.91 \pm 0.91 | Y9, R12, E13, G33, D34, V35, G36, A37, I48, S50, Q73, T74, P90 | K17 |
| 10 | Centroide | 1 | -11.59 \pm 0.49 | F104, Y108, R110, L137, N143, G145, A149, Y202 | K107, R146 |
| Venetoclax | Inicial | 1 | -9.07 \pm 1.03 | E104, Y108, R110, D111, E114, M115, Q118, V133, E136, L137, R139, D140, G141, N143, W144, G145, R146, F153, Y202 | |
| Taxol | Inicial | 2 | -6.97 \pm 0.60 | Y9, R12, M16, A37, A38, P39, P40, G41, D171, N172, L175, T178 | |

Conclusiones.

La búsqueda de inhibidores selectivos de la proteína anti apoptótica Bcl-2 es esencial para promover la apoptosis y superar la resistencia a la quimioterapia. Las moléculas seleccionadas cumplen con las reglas de Lipinski, sus perfiles farmacocinéticos son óptimos, seguros y con actividad antineoplásica potencial.

Agradecimiento.

Al Instituto Politécnico Nacional a través de la Secretaría de Investigación y Posgrado por el apoyo para el proyecto "Evaluación de la actividad apoptótica de compuestos miméticos BH3 selectivos a la proteína Bcl-2 en células de cáncer de mama"

Bibliografía.

- Caro-Gómez, L. A. *et al.* (2022) Anti-apoptotic Bcl-2 protein in apo and holo conformation anchored to the membrane: comparative molecular dynamics simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.*
- Ramos, J. *et al.* (2019). Shedding light on the interaction of human anti-apoptotic Bcl-2 protein with ligands through biophysical and in silico studies. *Int. J. Mol. Sci.*

ALTERNATIVE CONFORMATIONS OF AN INTRINSICALLY DISORDERED PROTEIN ASSOCIATED TO ITS IN VITRO ACTIVITY

David F. Rendón-Luna¹, Inti A. Arroyo-Mosso¹, Haydee De Luna-Valenciano^{1§}, Francisco Campos¹, Lorenzo Segovia², Gloria Saab-Rincón², Cesar L. Cuevas-Velazquez³, José Luis Reyes¹, and Alejandra A. Covarrubias^{1*}

¹Departamento de Biología Molecular de Plantas, ²Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Morelos, México. ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

*Corresponding author: alejandra.covarrubias@ibt.unam.mx

Palabras clave: Late embryogenesis abundant proteins, intrinsically disordered proteins, water deficit, chaperone-like activity.

Introduction

Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins are a group of intrinsically disordered proteins (IDPs) implicated in plant responses to water deficit (1). *In vitro* studies revealed that LEA proteins protect reporter enzymes from inactivation and aggregation during low water availability. Previous studies have highlighted that under conditions of water deficiency or macromolecular crowding, the N-terminal region, but not the C-terminal region, of these proteins adopts an alpha-helix conformation. This N-terminal region has been identified as being responsible for the *in vitro* protective activity (2). This study aims to investigate whether the attainment of alpha-helix conformation and/or particular amino acid residues are required for the *in vitro* protective role of LEA4 proteins. The LEA4-5 protein from *Arabidopsis thaliana* was used as a model to generate various mutant proteins. These mutants include point mutants altering conserved amino acids, deletion mutants removing specific conserved sections, and mutants introducing proline residues to hinder alpha-helix formation.

Methodology

In this work, we performed phylogenetic analyses and secondary structure predictions using specialized algorithms publicly available (3). The design and generation of mutants, and the expression of recombinant proteins were accomplished by means of standard methods. The purification of the IDPs was performed according to Campos et al. (4) or following the protocol for the IMPACT-NC system (New England Biolabs). Western blots were carried out according to standard protocols. Purified proteins were quantified by the Qubit Protein Assay Kit in a Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Protection efficiency against freeze-thaw treatment of LEA proteins was evaluated according to Rendón-Luna et al (5). Circular Dichroism (CD) Spectroscopy was performed as described by Cuevas-Velazquez et al. (2).

Results

The phylogenetic analysis performed using 275 LEA4 sequences agree with previous reports showing that the LEA4 proteins diverged early in their evolution into two subgroups. Furthermore, the annotated LEA4 proteins from bryophytes and from a fern do not group within any of the LEA4 subgroups, indicating that the emergence of the two divergent groups possibly came with the appearance of seed plants. To get insight into the AtLEA4-5 function, we first selected those amino acid residues showing the highest conservation in the N-terminal region, which was shown to be sufficient for AtLEA4-5 *in vitro* protective activity. The results from the protection assays did not show difference in the protective activity of these mutants as compared to the wild-type protein, indicating that changes in the most conserved residues of LEA4-5 do not lead to detrimental effects on its protective capacity under the conditions tested. To further search for those AtLEA4-5 regions that contribute to preserve the activity of target proteins under freeze-thaw stress, we generated different deletion mutants. In summary, the structural and functional evaluation of these

mutants indicated that when 56 residues from the N-terminus were removed a significant decrease in its protection activity was obtained (58%), which was further reduced when 77 residues were deleted leaving the so-called C-terminal region (24%). This mutant that lost the propensity to form alpha-helix and the ability to gain helicity under high osmolarity, still showed 24% of protection as compared to 74% detected for the wild-type protein, implying that it also contributes to the protective activity of the full-length LEA4-5 protein. To test the hypothesis that the formation of the alpha-helix could be relevant for the LEA4-5 protective function, we generated a mutant, where the helicity in the N-terminal region was disrupted by replacing nine amino acid residues by proline residues at positions interrupting regions with high propensity to form alpha-helix. The obtained data support the need of an alpha-helix conformation in this region to provide protection to the target enzyme upon freeze-thaw treatment and indicated that both AtLEA4-5 N- and C-terminal sections contribute to AtLEA4-5 protective activity. Intriguingly, when the proline mutations were introduced in the complete LEA4-5 protein, the protective activity of this mutant was similar to that achieved by the wild-type protein.

Conclusions

The results here indicate that conserved residues are not essential for LEA4-5 protective function. Interestingly, the C-terminal region was found to contribute to this function. Moreover, evidence suggests that alpha-helix conformation is necessary for the protective activity only when the N-terminal region is isolated from the rest of the protein. Remarkably, in the complete protein, LEA4-5 shows the ability to adopt alternative functional conformations under the tested conditions. These findings shed light on the intricate mechanisms by which LEA proteins protect against water deficit stress.

Acknowledgments

We thank Dr. Rosario Muñoz Clares for advisement during the analysis of the freeze-thaw assay data, M.C. B. Pérez-Morales for its valuable technical support, and Dr. Teresa Nava Ramírez for support in the analysis of protein properties. We are also grateful to the Unidades de Síntesis y Secuenciación de DNA and Proteómica of IBT-UNAM. This work was partially supported by grant FC-1615 from CONAHCyT. D.F.R.L. and I.A.A.M. are students of the Biochemical Sciences Graduate Program UNAM, supported by CONAHCyT PhD fellowships.

References

1. Hernández-Sánchez, et al. (2022) *J. Exp. Bot.* **73**, 6525-6546
2. Cuevas-Velazquez et al. (2016) *J. Biol. Chem.* **291**, 10893-10903
3. Potter et al. (2018) *Nucleic Acids Res.* **46**, W200-W204; Huang et al (2010) *Bioinformatics* **26**, 680-682; Edgar (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792-1797; Darriba et al. (2020) *Mol Biol Evol* **37**:291-294; Stamatakis (2006) *Bioinformatics* **22**, 2688-2690
4. Campos et al. (2011) *Protein Expr. Purif.* **80**, 47-51
5. Rendón-Luna et al. (2020) *Methods Mol. Biol.* **2141**, 519-528

¿CÓMO INTERVIENEN LAS PROTEÍNAS EN LA ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA ALZHEIMER?

Vanesa Montserrat Varela-Ortiz, Virginia Flores-Morales, Mayra Avelar, Laboratorio de Síntesis Asimétrica y Bio-quimioinformática (LSAyB), Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Zacatecas, Zac., 98160, vvarelaortiz@gmail.com

Palabras clave: Alzheimer, placas amiloides, proteína Tau

Introducción. Identificada por primera vez por Alois Alzheimer en 1906 (1), la enfermedad de Alzheimer (EA) representa una de las principales preocupaciones para la salud pública en el siglo XXI. La EA se caracteriza principalmente por el procesamiento anómalo de dos proteínas: los péptidos β amiloides ($A\beta$) y la proteína Tau, lo que conlleva a la formación de placas seniles extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT) (2). Esta enfermedad actualmente afecta a más de 24 millones de personas en todo el mundo, con 4.6 millones de casos nuevos cada año. La edad es el principal factor de riesgo. En promedio, una persona con Alzheimer vive de 8 a 20 años una vez diagnosticada (1).

El objetivo del presente trabajo es revisar, desde el punto de vista bioquímico, el papel de las proteínas en el desarrollo de la enfermedad del Alzheimer.

Metodología. Para la realización de esta revisión bibliográfica se llevó a cabo una búsqueda de artículos científicos, tomando como base Google Académico. Se utilizaron palabras claves como Alzheimer, péptidos β amiloides, proteína Tau. No se limitó el año de publicación en la búsqueda.

Resultados. Se ha postulado que el péptido β -amiloide ($A\beta$) es un determinante clave en la patogénesis de la EA. El péptido $A\beta$ se produce a través de la escisión secuencial de la proteína precursora de β -amiloide (APP) por β - y γ -secretasas. La APP y las secretasas relevantes son proteínas transmembranales que circulan a través de la vía secretora, de forma altamente regulada. La perturbación de su tráfico intracelular puede afectar las interacciones dinámicas entre estas dos proteínas (β -APP y γ -secretasas) alterando así la generación de $A\beta$ y acelerando la patogénesis de la enfermedad (3). La producción de $A\beta$ es un proceso normal, pero una sobreproducción de $A\beta$, o una mayor proporción de la forma de 42 aminoácidos, es suficiente para causar la aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer (2). Los datos de investigación indican que existe un cambio conformacional generalizado en las proteínas involucradas en la EA que forman motivos similares a láminas β . Aunque la conformación de estas láminas β

es común a muchas proteínas funcionales, la transición de hélice α a lámina β es una característica típica de los depósitos de amiloide. Cualquier anomalía en esta transición da como resultado la agregación de proteínas y la generación de fibrillas insolubles. Las proteínas anormales y tóxicas pueden interactuar con otras proteínas nativas y, en consecuencia, catalizar su transición al estado tóxico (4). Hasta la fecha, no existe un tratamiento efectivo que pueda prevenir la progresión de la enfermedad de Alzheimer; los medicamentos disponibles solo pueden retrasar el empeoramiento de los síntomas. Varios enfoques farmacológicos apuntan a reducir la formación de péptidos β -amiloides mediante la inhibición de las enzimas β -secretasas y γ -secretasas (5).

Conclusiones. La generación de péptido β -amiloide a partir de APP claramente contribuye a la neurotoxicidad asociada a la EA y juega un papel central en la patogénesis de la EA. Los avances en la identificación de las bases moleculares de la EA pueden servir como modelo para comprender las causas de esta enfermedad neurodegenerativa.

Agradecimiento. Los autores agradecen al LSAyB por la infraestructura y las facilidades para la realización de este trabajo. MA agradece a CONAHCYT por la beca posdoctoral, 364335. VMVO agradece la beca de alimentación por parte de la UAZ.

Bibliografía.

1. Irvine, G. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Molecular Medicine*, 14(7), 451-464.
2. Campanella, C., Pace, A., Caruso Bavisotto, C., Marzullo, P., Marino Gammazza, A., Buscemi, S., & Palumbo Piccionello, A. (2018). Heat shock proteins in Alzheimer's disease: role and targeting. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2603.
3. Jiang, S., Li, (2014). Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 9(1), 1-13.
4. M Ashraf, G., (2014). Protein misfolding and aggregation in Alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 13(7), 1280-1293.
5. Folch, J., (2018). Revisión de los avances en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer: estrategias para combatir la proteína β -amiloide. *Neurología* (Edición en inglés), 33 (1), 47-58.

**ARGININA CINASA DE LA JAIBA CAFÉ (*Callinectes bellicosus*): MAPEO DE
EPÍTOPOS POTENCIALMENTE ALERGÉNICOS**

Erika Yaret Durazo García; Enrique Rudiño Piñera²; Aldo Alejandro Arvizu Flores¹; María Lucila Rascón Durán¹; Alonso Alexis López Zavala¹, Universidad de Sonora, Departamento de Ciencias Biológicas, Hermosillo, Sonora 83000, a216201647@unison.mx Erika Yaret Durazo García

¹Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora

²Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Institución de Biotecnología, UNAM

Palabras clave: Alergias alimentarias (AA), Arginina cinasa (AK), Predicción de epítomos

Introducción. Las alergias alimentarias son consideradas un problema de salud pública por su prevalencia, siendo los crustáceos marinos de los alimentos más alergénicos (1). Nuestro grupo de trabajo identificó a la arginina cinasa de *Callinectes bellicosus* (CbAK) como uno de los principales alérgenos. Sin embargo, se desconocen los epítomos y su ubicación en la estructura tridimensional de la CbAK (2). El objetivo de este trabajo es mapear mediante análisis bioinformáticos a los epítomos inmunorreactivos a IgE en la estructura tridimensional de CbAK con el fin de analizar su importancia frente a la interacción espacial con IgEs.

Metodología. La secuencia de la CbAK se sometió a un análisis bioinformático con diversas herramientas incluidas el alineamiento múltiple de secuencias en el servidor UNIPROT. Además, se utilizaron diferentes algoritmos para la predicción de epítomos lineales como BepiPred (3). Adicionalmente, se construyó un modelo teórico de la estructura de la CbAK en el servidor AlphaFold 2 (4), con la información adicional de que en el PDB hay depositados varias estructuras de AKs de *Litopenaeus vanammei* y de *Scylla paramamosain*, con 27 y tres cambios de aminoácidos, respectivamente, con respecto a CbAK.

Resultados. El porcentaje de identidad de la CbAK con respecto a otras AKs de crustáceos es >90%. Con base en los resultados de los algoritmos de predicción, se seleccionaron nueve epítomos con alto potencial inmunorreactivo hacia IgEs, y se localizaron los epítomos propuestos en el modelo estructural de CbAK.

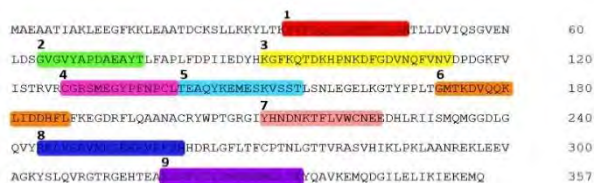


Fig. 1. Epítomos lineales predichos de la CbAK. Los epítomos están señalados como se describe a continuación: epítomo 1 en color rojo,

epítomo 2 en color verde, epítomo 3 en amarillo, epítomo 4 en color magenta, epítomo 5 en color cian, epítomo 6 en naranja y epítomo 7 en color salmón, epítomo 8 en color azul y el epítomo 9 en color morado.

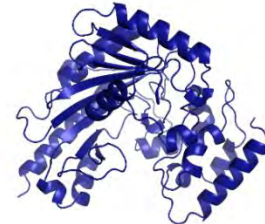


Fig. 2. Predicción de estructura tridimensional de la CbAK. El modelo fue obtenido a través de UNIPROT y mediante el uso de AlphaFold 2.

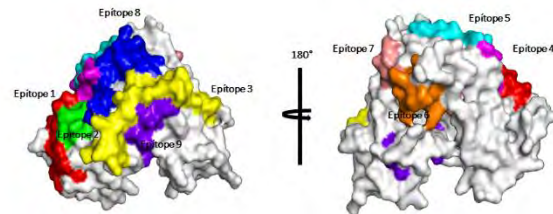


Fig. 3. Mapeo de epítomos señalados por colores de la estructura tridimensional del modelo teórico de CbAK. Los epítomos están señalados de la misma manera que en la figura 1.

Conclusiones. Se proponen nueve epítomos potencialmente alergénicos ubicados en la superficie de la CbAK y que son susceptibles de interactuar con IgEs humanas.

Agradecimiento. A CONAHCYT por la beca otorgada, al proyecto USO313008866 y al programa de intercambio académico UNAM-UNISON/2023.

Bibliografía.

1. Iglesias, E. M. 2018. *Pedi ia ntegral atr I*. XXII (2): 87–93.
2. Brassea-Estardante, H.A., Martínez-Cruz, O., Cárdenas-López, J.L., García-Orozco, K.D., Ochoa-Leyva A., López-Zavala, A.A. 2022. *Mol. Immunol.* Vol (143): 147-156.
3. Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. 2017. *Nucleic Acids Res.* Vol (45): 24-29.
4. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. 2021. *Nature.* Vol (596): 583–589.

MUTACIÓN DE LA CHAGASINA DE *Trypanosoma cruzi* PARA INCREMENTAR SU EXPRESIÓN SOLUBLE EN *Escherichia coli*

Rodríguez-Sánchez, M. I., Agustín-Vélez, P. E., Flores-Pucheta, C. I. y Ortega-López, J.
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco
Ciudad de México, c.p. 07000, marco.rodriguez@cinvestav.mx

Palabras clave: Chagasina, mutación, expresión.

Introducción. Inhibidora de cisteín proteasas, la chagasina es una proteína originaria de *T.cruzi* con características estructurales definidas(1); Ha sido empleada como andamio molecular para la expresión de epítopos (candidatos a antígenos vacunales) en sustitución de los giros estructurales L4 y L6, con el propósito de lograr su expresión soluble en *E. coli*(2). Se propone realizar mutación asistida *in silico*, excluyendo los giros mencionados para incrementar su solubilidad y verificar mediante expresión en *E. coli*.

Metodología. Se realizó mutación asistida en Aggrescan3D v2.0(3) modificando residuos susceptibles a agregación; La estructura tridimensional de las mutantes se predijo en AlphaFold2(4), la solubilidad en Camsol v2.3(5), similitud estructural en ZhongLab(6) y acoplamiento molecular a la cruzipaína (PDB: 1ME3) en HADDOCK v2.4(7). Posterior a esto se normalizaron los datos de score de solubilidad con respecto a la chagasina no mutada y finalmente para la verificación se subclonaron los genes y expresaron en el sistema pCri (pCri8a) en *E. coli* BL21(DE3), a condiciones: medio 2TY, 18°C, 0.5mM IPTG, 18h y 150 rpm.

Resultados.

Tabla 1. Aminoácidos susceptibles a mutación de la chagasina. Indicando aminoácidos posibles a sustituir, cambio energético y solubilidad normalizada de scores de Aggrescan3D y Camsol.

| Aa. | Aa. por sustituir | Efecto energético (kcal/mol) | Solubilidad normalizada |
|--------|-------------------|------------------------------|-------------------------|
| Val 18 | Arg | -0.314 | 2.5085 |
| | Lys | -0.377 | 2.4865 |
| Phe 58 | Arg | 0.605 | 2.3204 |
| | Lys | 0.635 | 2.3119 |
| Met 1 | Arg | -0.196 | 2.5085 |
| | Lys | -0.158 | 2.4865 |

Tabla 2. Mutaciones dobles en los sitios V18 y R58 por lisina o arginina, solubilidad normalizada, semejanza a la chagasina nativa (TM-score), confianza de modelado 3D (pLDDT), punto isoeléctrico (pI) y HADDOCK-score (HD-score).

| Mutación | Solub. | TM | pLDDT | pI | HD-score |
|--------------|--------|--------|-------|-------|----------------|
| Chagasina WT | 2.000 | 1.0000 | - | 6.377 | -125.3 +/-0.6 |
| V18R-F58R | 2.838 | 0.9673 | 92.4 | 8.215 | -136.3 +/-11.3 |
| V18R-F58K | 2.820 | 0.9678 | 92.2 | 8.158 | -126.0 +/-2.5 |
| V18K-F58R | 2.818 | 0.9672 | 92.5 | 8.158 | -125.2 +/-1.3 |
| V18K-F58K | 2.799 | 0.9673 | 93.8 | 8.109 | -133.4 +/-8.4 |

Se seleccionaron las mutaciones dobles debido al incremento significativo en predicción de solubilidad (~140%) y su bajo cambio estructural (<5%). Y pese a estar la Phe-58 contigua al giro L4 (involucrado en la actividad), la predicción energética de interacción con la cruzipaína simula no tener cambios significativos.

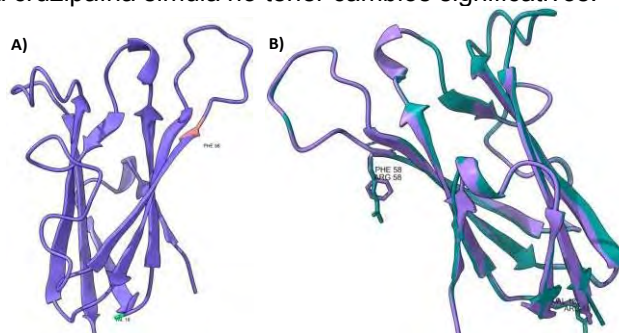


Figura 1. A) Estructura 3D de la chagasina y sitios de mutación, Val-18 (verde) y Phe-58 (naranja). B) Superposición estructural de la chagasina (púrpura) y mutante V18R-F58R (verde).

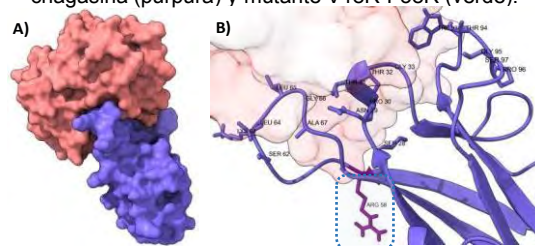


Figura 2. A) Complejo cruzipaína-chagasina(V18R-F58R), rosa y púrpura respectivamente. B) Interacción de los residuos activos de la chagasina V18R-K58R y la cruzipaína ilustrando la Arg-58 (púrpura).

Conclusiones. La sustitución de Val-18 y Phe-58 por Arg y Lys se presentan como mutaciones idóneas para incrementar la solubilidad, manteniendo su estructura y estabilidad de unión a la cruzipaína.

Agradecimiento. A CONAHcyT por la fuente de financiamiento (269657, A1-S34224) y por la beca para estudios de maestría número 830969.

Bibliografía.

1. Salmon, D. (2006). *J Mol Biol.*, 357(5), 1511–1521.
2. Cárdenas, R. (2023). (En preparación). *DBB-CINVESTAV-IPN*.
3. Pujols, Santos, Kuriata (2022). *Methods Mol Biol.* 2406:65-84.
4. Jumper, Evans, Pritzel, Green (2021) *Nature.* 596:590-596
5. Sormanni, Aprile, Vendruscolo (2015). *J Mol Biol.* 427(2):478-490
6. Xu, J. (2010) *Bioinformatics*, 26, 889-895 (2010).
7. Van Zundert (2016). *J Mol Biol.* 428, 720-725.

DISEÑO BIOINFORMÁTICO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE CHAGASINA CON 3 Y 4 EPÍTOPOS DE TSA-1, POSIBLE ANTÍGENO VACUNAL CONTRA CHAGAS

Agustín-Vélez Paola E., Marco I. Rodríguez-Sánchez, Claudia I. Flores-Pucheta, Jaime Ortega-López.

CINVESTAV-IPN, Depto. De Biotecnología y Bioingeniería, Ciudad de México, c.p 07360.

paola.agustin@cinvestav.mx

Palabras clave: Chagas, solubilidad, antígeno

Introducción. La enfermedad de Chagas es considerada una enfermedad desatendida que afecta principalmente regiones marginadas de América Latina (1). El agente etiológico causante de esta enfermedad es el parásito intracelular *Trypanosoma cruzi*, el cual produce proteínas involucradas en el proceso infeccioso como lo es TSA-1, un antígeno de superficie con 5 epítopos capaces de inducir la respuesta inmunológica de linfocitos T-citotóxicos (2). Estudios anteriores indican que la producción recombinante de TSA-1 en *E. coli* se da de forma insoluble, donde la proteína se encuentra mal plegada (3), por lo que se ha propuesto diseñar proteínas de fusión solubles utilizando como andamio molecular a la chagasina de *T. cruzi*, sustituyendo únicamente 2 epítopos de TSA-1 en los giros L4 y L6 (4).

El objetivo de este trabajo es diseñar mediante análisis bioinformático proteínas quiméricas de chagasina que contengan en su estructura 3 y 4 epítopos de TSA-1, así como predecir su solubilidad *in silico* para evaluar su posterior expresión heteróloga.

Metodología. La secuencia de los 5 epítopos de TSA-1, así como la secuencia de la chagasina de *T. cruzi* fueron recuperadas de la base de datos UniProt. Se llevaron a cabo diversas combinaciones mediante programación con Python 3.0, sustituyendo la secuencia de 5 epítopos de TSA-1 en los giros L2, L4 y L6 de la chagasina para obtener proteínas quiméricas de 3 epítopos. Dos epítopos distintos se sustituyeron en L4 mediante el uso del linker GSGS para generar proteínas quiméricas de 4 epítopos. Al tener las secuencias de las proteínas, se predijeron sus estructuras 3D con AlphaFold 2.0 (5), donde a su vez, se obtuvieron sus puntajes de confianza mediante el valor pLDDT. Posteriormente se realizó la predicción de solubilidad de las proteínas quiméricas con los servidores CamSol Structural Corrected (6) y Aggrescan3D (7). Los puntajes obtenidos se normalizaron y se seleccionaron 2 quimeras de 3 epítopos y 2 quimeras de 4 epítopos.

Resultados. 60 proteínas quiméricas de 3 epítopos y 120 proteínas quiméricas de 4 epítopos se obtuvieron inicialmente, de las cuales se predijo su solubilidad.

Posteriormente se descartaron aquellas quimeras que tuvieran en su estructura al E4 ya que los servidores indicaron que eran altamente insolubles, además, se decidió contemplar aquellas proteínas que tuvieran en su estructura al E5 sustituido en L4 ya que estudios anteriores demuestran que esta sustitución aumenta la solubilidad de forma experimental (4). Finalmente se seleccionaron 2 proteínas quiméricas con 3 epítopos y 2 proteínas con 4 epítopos que tuvieran un valor pLDDT superior a 70.

Tabla 1. Proteínas quiméricas de chagasina seleccionadas para su posterior producción heteróloga.

| Quimera | Epítopos | | | Solubilidad normalizada | pLDDT |
|---------------------|----------|---------|----|-------------------------|-------|
| | L2 | L4 | L6 | | |
| Chagasina WT | L2 | L4 | L6 | 2.0 | - |
| Q3E_6 | E1 | E3 | E5 | 1.92 | 73.6 |
| Q3E_34 | E3 | E5 | E1 | 1.69 | 82.5 |
| Q4E_19 | E1 | E5 y E2 | E3 | 1.81 | 78.1 |
| Q4E_109 | E5 | E3 y E1 | E2 | 1.85 | 70.1 |

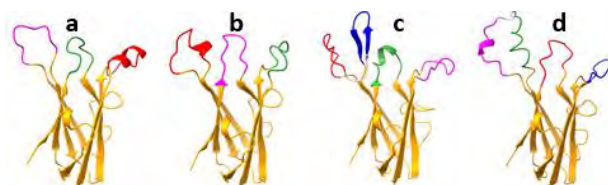


Figura 1. Quimeras de chagasina seleccionada. E1 verde, E2 azul, E3 magenta, E5 rojo. a)Q3E_6 b)Q3E_34 c)Q4E_19 d)Q4E_109

Conclusiones. El diseño bioinformático de proteínas quiméricas de chagasina con epítopos de TSA-1 permite realizar un análisis considerando principalmente su solubilidad, factor fundamental para su producción y posible uso como antígeno vacunal.

Agradecimiento. A CONAHCyT por el financiamiento (269657, A1-S34224) y por la beca para estudios de maestría número 829991.

Bibliografía.

- Haberland, Munoz (2013). *Clin Chem Lab Med*.51:271-294.
- Wrightstamm, Dawson, Fouts(1994). *J Immunol*. 153(7):3148-54.
- De la Cruz, Villanueva, Ortega, Flores, Gillespie. Dumonteil (2019) *Hum Vaccin Immun*. 15:210-219
- Nava Pintor EE. (2018). Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. México
- Jumper, Evans, Pritzel, Green (2021) *Nature*. 596:590-596
- Sormanni, Aprile, Vendruscolo(2015). *J Mol Biol*. 427(2):478-490
- Pujols, Santos, Kuriata (2022). *Methods Mol Biol*. 2406:65-84.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE MUTACIONES DE RESISTENCIA A ORIZALINA EN *TOXOPLASMA GONDII* EMPLEANDO MÉTODOS COMPUTACIONALES

Carlos D. Flores-León, Laura Dominguez, Rodrigo Aguayo-Ortiz

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510. Correo electrónico: carlosdan981@gmail.com

Palabras clave: Orizalina, α -tubulina, *Toxoplasma gondii*

Introducción.

La Orizalina (ORY) es una dinitroanilina que inhibe la polimerización de los microtúbulos en plantas y protozoarios parásitos como resultado de su interacción con la subunidad de α -tubulina (1). Ensayos de mutagénesis en *Toxoplasma gondii* permitieron la identificación de mutaciones de resistencia a ORY en residuos de α -tubulina (TgAT) (2).

En el presente trabajo se busca explicar el efecto de las mutaciones en la afinidad de ORY a TgAT mediante el uso de aproximaciones de dinámica molecular (DM) y transmutación atómica.

Metodología.

Para este estudio se evaluaron 3 réplicas de DM de 200 ns del complejo TgAT-ORY. Para la predicción de la estabilidad de ORY en TgAT, se estudiaron las 32 mutaciones resistencia reportadas con el servidor mCSM-lig (3). Con las mutaciones que presentaron mayores cambios en la afinidad de ORY, se calculó su energía libre de unión con el método de transmutación atómica PMX (4). Para la predicción de la estabilidad de las mutaciones T239I, R243S y V252L de TgAT, se calculó su energía libre con PMX y 10 servidores online. Finalmente, se realizaron DM de TgAT silvestre (WT) y R243S en sus formas apo, con el sitio de unión de ORY abierto y cerrado. Estas simulaciones fueron analizadas con MDAnalysis (5) y POVME (6).

Resultados.

Con base en la doble diferencia de la energía libre de unión ($\Delta\Delta G$) de las mutaciones (Fig. 1) se obtuvo que V4L, S6I, H8Y y F52I alteran significativamente la afinidad de ORY por TgAT. Por su parte, L136F y V202F implican el cambio de un residuo pequeño por uno grande, lo cual impide la internalización de ORY al sitio de unión. Por su parte, T239I, R243S y V252L no mostraron cambios en la afinidad del ligando.

Con PMX y servidores en línea, se determinó que T239I y V252L no alteran la estabilidad de la proteína ($\Delta\Delta G_{folding}^{Mutation} \approx 0 \text{ kcal mol}^{-1}$), pero disminuyen su flexibilidad ($\Delta S_{vib} < 0 \text{ kcal mol}^{-1} K^{-1}$). En el caso de R243S, se observó un aumento en la flexibilidad de la región que comprende el sitio de unión. Los estudios

de DM mostraron la pérdida de un puente salino entre el R243 y E27, lo cual provoca un aumento en el ángulo de torsión de H7 y el cierre del sitio de unión. Esto último podría impedir la internalización de ORY al sitio propuesto.

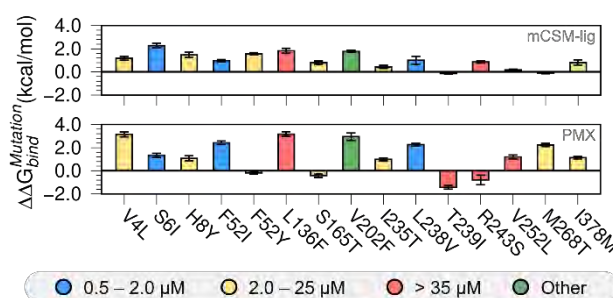


Fig. 1. Doble diferencia de energía libre de unión calculados con mCSM-lig y el método alquímico PMX.

Conclusiones.

Nuestros resultados muestran que las mutaciones L136 y V202F disminuyen la afinidad de ORY hacia TgAT, mientras que T239I y V252L disminuyen la flexibilidad de TgAT. Los predictores en línea determinaron que R243S disminuye la estabilidad de TgAT por la pérdida de interacción con E27, lo cual fue comprobado mediante DM.

Agradecimiento. R. Aguayo-Ortiz (LANCAD-UNAM-DGTIC-398) y L. Dominguez (LANCAD-UNAM-DGTIC-306) agradecen a la DGTIC en el uso de "Miztli". Este trabajo fue financiado por UNAM-DGAPA (PAPIIT IA2011022).

Bibliografía.

- C. Pham et. al. (2010) *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol (54) 1453-1460.
- C. Pham et. al. (2008) *Genetics.* Vol (180) 845-856.
- D.E.V. Pires et. al. (2016) *Sci. Rep.* Vol (6) 1-8.
- V. Gapsys, B.L. De Groot (2017) *J. Chem. Inf. Model.* Vol (57) 109-114.
- R. Gowers et. al. (2016) *Proc. 15th Python Sci. Conf.*, 98-105.
- J.R. Wagner et. al. (2017) *J. Chem. Theor. Comput.* Vol (13) 4584-4592.

EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE VARIANTES EN LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA ALFA-I-IDURONIDASA HUMANA.

Darinka Pamela Durán-Gutiérrez, José Luis Castrejón-Flores, César Augusto S. Reyes-López.
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, ENMyH, Instituto Politécnico Nacional. Guillermo Massieu Helguera, No. 239, Fracc. "La Escalera", Ticomán, C.P. 07320, Ciudad de México, México. Correo electrónico: careyes@ipn.mx

Palabras clave: variantes, alfa-L-Iduronidasa, sobreexpresión.

Introducción. La alfa-L-Iduronidasa humana (IDUA) es una enzima lisosomal que participa en el metabolismo secuencial de los glucosaminoglucanos heparán y dermatán sulfato (1). Las variantes localizadas en el gen que codifica para esta enzima disminuyen la actividad enzimática, llevando al desarrollo de Mucopolisacaridosis de Tipo I (MPS I), la cual se caracteriza por la presencia de deformidades esqueléticas, cardiopatías y retraso mental en grados variables (1, 2). A la fecha se han reportado más de 200 variantes patogénicas, sin embargo, aún se desconoce el impacto que tienen diversas variantes en las propiedades estructurales y funcionales de la enzima (3).

El objetivo de este trabajo fue determinar el impacto de algunas variantes localizadas fuera del sitio activo, en la expresión y actividad catalítica.

Metodología. El plásmido pcDNA3.1 + IDUA cDNA, fue sometido a mutagénesis con oligonucleótidos específicos para las variantes P533R, S633L y S633W (1). La enzima silvestre y las variantes se sobreexpresaron en la línea celular HEK293, evaluando la presencia de IDUA, en extractos totales de proteínas de diferentes clonas, mediante western blot. La actividad enzimática se determinó con el sustrato sintético 4-MUI, incubando durante 30 min (4).

Resultados. Se evaluó la presencia de IDUA en clonas de cada variante encontrando una menor sobreexpresión de la enzima en comparación con la forma silvestre. Además, en algunas clonas no se observaron las formas procesadas de la enzima y la mayoría sobreexpresaron únicamente la forma inmadura de la IDUA (Fig. 1). Ensayos de solubilidad de las variantes mostraron que alrededor del 20 al 50 % de la enzima se encuentra en la forma no soluble. Estos datos sugieren que la presencia de una variante condiciona alteraciones durante el plegamiento, lo que evitaría el paso por el control del retículo endoplásmico; además de disminuir la maduración y la solubilidad de la enzima expresada, volviéndola susceptible de precipitarse. Adicionalmente, los ensayos preliminares de actividad enzimática con el sustrato sintético

empleado para el diagnóstico de MPS-I, mostraron que las variantes afectan significativamente las propiedades catalíticas de la enzima (Fig. 2).

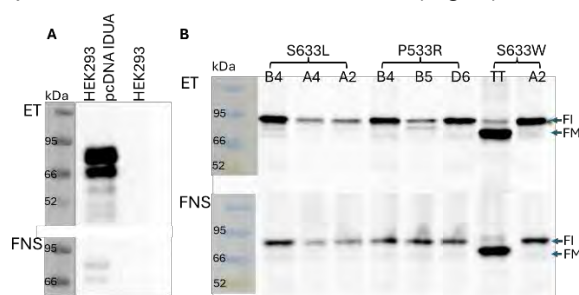


Fig. 1. Inmunodetección de IDUA en A: extractos totales (ET) de HEK293 y HEK293 sobreexpresando la IDUA silvestre y B: ET y fracción no soluble (FNS) de clonas de variantes. FI: Forma inmadura. FM: Forma madura.

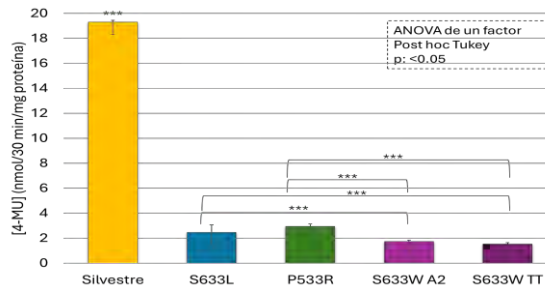


Fig. 2. Actividad enzimática de IDUA silvestre y variantes.

Conclusiones. El fenotipo de MPS-I podría deberse tanto a la afectación en la actividad enzimática, como a alteraciones en la estabilidad y solubilidad de la enzima. Un análisis detallado de la estabilidad y función de diferentes variantes podrían ser predictores para el desarrollo de los diferentes fenotipos de MPS I.

Agradecimiento. Agradecemos a Conahcyt por el apoyo financiero proporcionado.

Bibliografía.

- Bie, H., Yin, J., He, X., Kermode, A.R., Goddard-Borger, E.D., Withers, S.G., James, M.N. 2013. Nat. Chem. Biol.; 9, 739-745.
- Maita, N., Tsukimura, T., Taniguchi, T., Saito, S., Ohno, K., Taniguchi, H. 2013. Proc. Natl. Acad. Sci.; 110, 14628-14633.
- Peña-Gomar I., Jiménez-Mariscal J., Cerón M., Rosas-Trigueros J., Reyes-López C.A. 2021. The Protein Journal.; 40, 68-77.
- Ou L., Herzog T.L., Wilmot C.M., Whitley C.B. 2014. Mol. Genet. Metab.; 111, 113-115.

Hialuronan sintasa de *Pasteurella multocida*: Bases moleculares del reconocimiento al sustrato UDP-N-acetilglucosamina

Flores-Pacheco Gerardo¹, Raga-Carbajal Enrique², Aguayo Rodrigo³, Rudiño Enrique¹, Ayala Marcela¹, Olvera-Carranza Clarita¹

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.

²Universidad Técnica de Múnich Campus Straubing.

³Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Email: gerardo.flores@ibt.unam.mx, enrique.raga@tum.de, rodaguayo@comunidad.unam.mx, rudino@ibt.unam.mx, marcela.ayala@ibt.unam.mx, clarita.olvera@ibt.unam.mx

Palabras clave: ácido hialurónico, enzimas activas a carbohidrato, relación estructura-función de proteínas.

Introducción. La hialuronan sintasa de *Pasteurella multocida* (pmHAS) es responsable de la síntesis del ácido hialurónico (AH), el cual es glicosaminoglicano (GAG) compuesto por unidades repetidas de disacáridos, formados por combinación de una N-acetilglucosamina (GlcNAc) y un ácido glucurónico ((2 y 3). Debido a las importantes aplicaciones que tiene el AH en la industria médico-farmacéutica y cosmetológica (1), existe un gran interés en entender los mecanismos moleculares de la síntesis de este biopolímero. Este trabajo pretende generar información sobre los elementos estructurales involucrados en el reconocimiento del UDP-GlcNAc de pmHAS.

Metodología. Se llevó a cabo un modelo por homología de la pmHAS. Se realizaron estudios *in silico*, como acoplamiento y dinámica molecular empleando para identificar los posibles residuos involucrados en el reconocimiento al sustrato. Se llevó a cabo la expresión heteróloga, purificación y caracterización de mutantes de pmHAS en los residuos que posiblemente participan en el reconocimiento determinando la actividad enzimática mediante el consumo del sustrato UDP-GlcNAc por un ensayo enzimático acoplado y el perfil de los productos de reacción por HPLC (4).

Resultados. Derivado de los estudios de acoplamiento y dinámica molecular se identificaron 11 residuos posiblemente involucrados en el reconocimiento a la UDP-GlcNAc (Fig. 1).

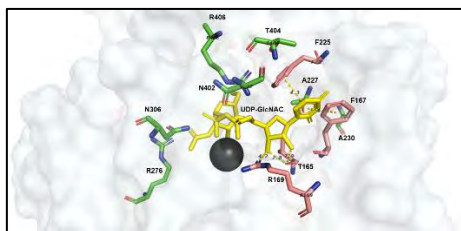


Fig. 1. Acoplamiento molecular de pmHAS con el sustrato UDP-GlcNAc. Ligando UDP-GlcNAc (color amarillo); residuos que interactúan con el sustrato (color verde y salmón); ion Mn^{2+} (círculo gris).

De este estudio podemos destacar: la T165, donde el grupo carboxilo de la cadena principal parece interactuar con el O2 y O3 del carbono dos y tres de la ribosa del UDP a través de un puente de hidrógeno;

la R169, la cual interacciona con el O1 del fosforo alfa ($P\alpha$) y los anillos bencénicos de la F167 y F225, parecen tener interacciones de apilamiento con el uracilo del UDP. Se generaron y analizaron las mutantes T165A y F225A. Los resultados mostraron una pérdida de la actividad del 90%, demostrando la importancia de las interacciones de estos residuos en el reconocimiento al sustrato UDP-GlcNAc.

Por otro lado, estudios *in silico* de predicción de los efectos de mutaciones simples sobre la interacción proteína-ligando, calculando los cambios de afinidad (PremPLI) sugirieron que el cambio por la P del residuo T165, llevaría a un aumento en la afinidad de unión de la UDP-GlcNAc con la pmHAS. La mutante T165P, mostró un incremento del 42% en la actividad comparada con pmHAS WT. Los parámetros cinéticos de la mutante T165P como la K_m , disminuyó 12 veces (T165P 0.006mM vs pmHAS WT 0.078mM) para el UDP-GlcUA, mientras que, para la UDP-GlcNAc disminuyó 4 veces (T165P 0.035mM vs pmHAS WT 0.123mM). Asimismo, la eficiencia catalítica (kcat/km), aumentó cuatro veces para el UDP-GlcUA, 276 (71.67 pmHAS), mientras que para la UDP-GlcNAc fue de 1.5 veces mayor 42.5 comparado con pmHAS (30.17).

Conclusiones.

Nuestro trabajo demuestra la importancia de la F225 y la F167 en el reconocimiento a UDP-GlcNAc, posiblemente estabilizando este sustrato a través de interacciones de apilamiento. Asimismo, la modificación por la P en el residuo T165 generó una enzima con una mayor eficiencia catalítica probablemente debido a un ajuste en el loop contiguo a la P165, conllevando a un rearrreglo de las cadenas laterales, como de la F167, lo cual permitió una mejor interacción con el ligando, favoreciendo a una correcta posición y orientación del ligando.

Agradecimiento. A CONACYT por la beca otorgada con número 388112.

Bibliografía.

1. Laurent TC, Fraser JR (1992) Hialuronano. FASEB J 6: 2397–2404.
2. De Angelis PL, et al. J Biol Chem. 15 de septiembre de 1993; 268 (26): 19181–4.
3. Jing W, PL DeAngelis. Glicobiología 2003 10B, 13, 661–671.
4. Joanne C. Krupa, et al. Analytical Biochemistry 361 (2007) 218–225

Estructura del complejo proteasa – inhibidor entre tripsina y M271. Nuevo mecanismo de inhibición

Alexis Omar Campuzano González, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, 62130.

Enrique Rudiño Piñera, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, 62130.

Palabras clave: inhibidor, complejo, estructura

Introducción. Los inhibidores proteicos de proteasas tipo Kunitz-STI de plantas, poseen un mecanismo “canónico” de inhibición el cual secuestra a la proteasa blanco y le impide hidrolizar otras proteínas. En las estructuras reportadas el inhibidor utiliza el asa 4 para unirse al sitio activo de la proteasa, esta asa posee una arginina que es la que identifica la proteasa y guía la unión. Aunque varios residuos de ambas proteínas participan para estabilizar el complejo. Otro mecanismo “no canónico” se ha reportado. Sin embargo, existe un único ejemplo con el asa 9 de un inhibidor. Aquí presentamos un nuevo mecanismo no canónico, pero por medio del asa 1 del inhibidor.

Metodología. El inhibidor se expresó heterológicamente en una cepa de *Pichia pastoris*. Posteriormente se purificó por medio de una columna de afinidad a níquel. El complejo se formó en un buffer de TRIS-HCL 10 mmol con CaCl 10 mmol pH 8. El complejo se concentró hasta concentraciones de 10 mg/mL y posteriormente se hicieron pruebas de cristalización. El cristal obtenido se difractó en las instalaciones del LANEM de la UNAM obteniendo un patrón de difracción a 2.4 Å.

Resultados. La estructura determinada del complejo proteasa – inhibidor nos mostró un nuevo mecanismo de unión de los inhibidores Kunitz-STI. Este nuevo mecanismo se une por medio del asa 1 del inhibidor M271. Lo más interesante de este nuevo mecanismo es que tanto el mecanismo “canónico” como “no canónico” previamente reportados utilizaban un aminoácido básico (arginina o lisina) para guiar la unión del inhibidor a la proteasa. Sin embargo, en esta nueva estructura el inhibidor utiliza un triptófano como aminoácido guía para la unión a la proteasa. Igualmente, con el resto de los complejos previamente reportados, la interfaz entre ambas proteínas presenta varios aminoácidos que interactuando por medio de clústeres hidrofóbicos y puentes de hidrógeno para estabilizar el complejo y de esa forma mantener estable la unión de ambas proteínas y del complejo

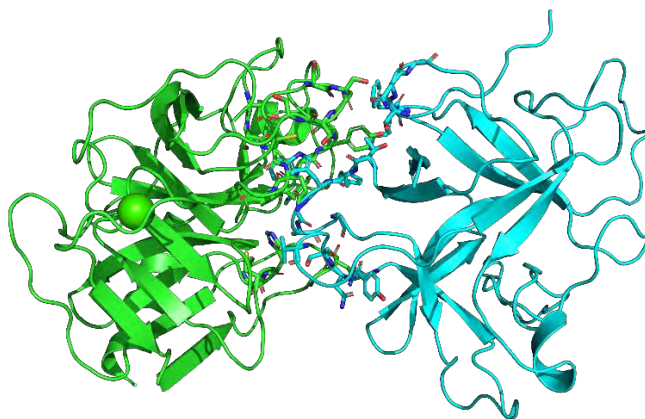


Fig. 1. Complejo entre tripsina (izquierda, verde) y M271 (derecha, cyan). En la interfaz entre ambas proteínas se muestran los residuos que interactúan para mantener la estabilidad del complejo.

Conclusiones. El complejo proteasa – inhibidor entre tripsina y el inhibidor M271 presenta un mecanismo de unión novedoso sin ningún reporte previo. Esta unión utiliza un asa no reportada como sitio de unión a proteasas. Sin embargo, la interfaz entre ambas proteínas es la responsable de brindar la estabilidad del complejo. Esto nos dice que no se trata solo del sitio de unión del inhibidor a la proteasa, sino de las interacciones que se forman entre ambas proteínas para garantizar la unión y estabilidad del complejo.

Bibliografía.

1. Guerra, Y, Armijos-Jaramillo, V, Pons, T, Tejera, E, Berry, C. 2023. *PS*. 32 (2): e4570.
2. Bendre, A, Ramasamy, S, Suresh, C. 2018. *IJoBM*. 113: 933-943.
3. Hellinger, R, Gruber, C. 2019. *DDT*. 24(9): 1877-1889
4. Xu, Y, Zhang, P, Liu, X, Wang, Z, Li, S. 2020. *ABaB*. 191(3): 1207-1222.



IMPLICACIONES DE RESIDUOS NO CATALÍTICOS EN LA ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD DE LA BADH DE RIÑÓN DE CERDO

Anabel Félix Arredondo¹, Elisa M. Valenzuela Soto², José Guadalupe Soñanez¹ Organis¹, César Muñoz Bacasehua¹, Norma Aurora Stephens Camacho³, Jesús Alfredo Rosas Rodríguez¹. 1. Universidad de Sonora. Blvd. Lázaro Cárdenas No.100, Col. Francisco Villa, Navojoa, Sonora. CP. 85880. a217204113@unison.mx. 2. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, Hermosillo, Sonora. CP. 83304.

Mutación, triptófanos, fluorescencia

Introducción. La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, betaína aldehído: NAD⁺ oxidoreductasa, EC 1.2.1.8) cataliza la conversión de betaína aldehído (BA) a glicina betaína (GB) (1). Su estructura activa es un homotetrámero de 232 kDa y contiene cuatro sitios activos, así como cuatro residuos triptófanos (W) por subunidad. Se ha descrito que la proximidad de los triptófanos 156 y 165 al sitio activo y específicamente cercanos al sitio de unión a la coenzima, permite el seguimiento de la interacción de la enzima con la molécula de NAD⁺ (2-3). En estudios previos, se demostró que el ion potasio juega un papel importante en la estabilidad estructural de la pkBADH, indicando que este favorece la formación del complejo pkBADH-NAD⁺, encontrándose cambios en la estructura debido a la exposición de los triptófanos cercanos al sitio de unión del NAD⁺ (4).

Por lo anterior, en este trabajo se realiza una mutación dirigida de Trp con el objetivo de demostrar la participación que tienen algunos de los residuos no catalíticos en la formación del complejo enzima-NAD⁺, así como su impacto en la estabilidad estructural y actividad de la pkBADH.

Tabla 1. Efecto del potasio en la constante de asociación de Stern–Volmer y fracción accesible para la interacción de pkBADH con NAD⁺.

| [K ⁺] mM | 0-200µM [NAD ⁺] | | | 250-800µM [NAD ⁺] | | |
|----------------------|---|------|----------------|---|------|----------------|
| | K _s (10 ⁻⁶ µM ⁻¹ s ⁻¹) | α | R ² | K _s (10 ⁻⁶ µM ⁻¹ s ⁻¹) | α | R ² |
| 0 | 0.005 ± 0.04 | 0.72 | 0.982 | 0.1 ± 0.15 | 0.34 | 0.976 |
| 25 | 0.008 ± 0.02 | 0.71 | 0.985 | 0.07 ± 0.11 | 0.4 | 0.988 |
| 50 | 0.007 ± 0.01 | 0.79 | 0.991 | 0.06 ± 0.13 | 0.46 | 0.987 |
| 100 | 0.007 ± 0.01 | 0.80 | 0.996 | 0.06 ± 0.12 | 0.47 | 0.987 |

Tabla 2. Efecto del potasio en la constante de asociación de Stern–Volmer y fracción accesible para la interacción de W165F de la pkBADH con NAD⁺.

| [K ⁺] mM | 0-200µM [NAD ⁺] | | | 250-800µM [NAD ⁺] | | |
|----------------------|---|------|----------------|---|------|----------------|
| | K _s (10 ⁻⁶ µM ⁻¹ s ⁻¹) | α | R ² | K _s (10 ⁻⁶ µM ⁻¹ s ⁻¹) | α | R ² |
| 0 | 0.02 ± 0.009 | 0.76 | 0.977 | 0.35 ± 0.02 | 0.62 | 0.98 |
| 25 | 0.02 ± 0.007 | 0.81 | 0.98 | 0.23 ± 0.02 | 0.68 | 0.987 |
| 50 | 0.03 ± 0.02 | 0.78 | 0.779 | 0.22 ± 0.01 | 0.69 | 0.993 |
| 100 | 0.02 ± 0.01 | 0.81 | 0.907 | 0.18 ± 0.02 | 0.67 | 0.992 |

Conclusión. Los espectros de extinción de la mutante muestran una reducción en el rendimiento cuántico del triptófano 156 en presencia del NAD⁺, en comparación con la no mutada. Esto puede explicar el rol del Trp 156 en la formación del complejo pkBADH-NAD⁺. La constante de asociación y la fracción accesible del triptófano muestran una mayor exposición del triptófano 156 en la mutante, así como una estructura más relajada. Finalmente, la mutación de W165F no afecta la actividad de pkBADH, sin embargo, el número de sitios activos funcionales disminuye a la mitad en la pkBADH que contiene la mutación.

Agradecimiento.

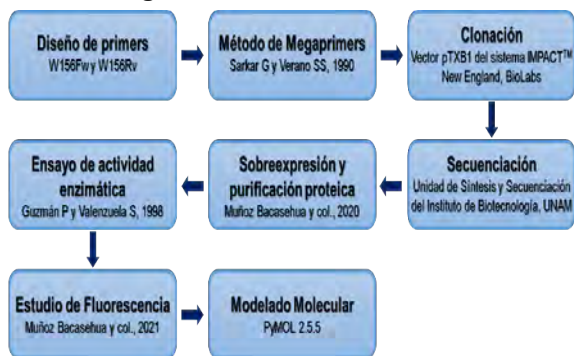


CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

Metodología.



Resultados.

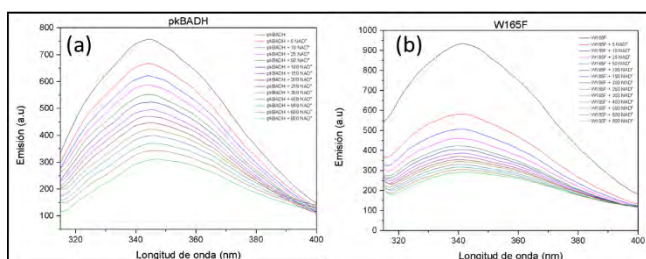


Fig. 1. Espectros de extinción de fluorescencia titulados con concentraciones variables de NAD⁺. (a) pkBADH, (b) W165F de la pkBADH.

Bibliografía.

- Guzmán, A y Valenzuela, E. (1998) Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 119: 485-491.
- Rodríguez, R y Valenzuela, E. (2011) Chem Biol Interact. 91(1): 159-164.
- Muñoz, C y col. (2020) Journal of bioenergetics and biomembranes. 52(2): 61–70.
- Muñoz, C y col. (2021) Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence. 36(7): 1733–1742

LA PROTEÍNA G0S2, ANÁLISIS DE INTERACCIÓN DEL COMPLEJO G0S2/BCL-2.

Ligia Vega Becerra¹, Gabriela M. Montero-Morán² y Samuel Lara-González¹.

¹Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C, División de Biología Molecular, San Luis Potosí 78216. ²Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, San Luis Potosí, 78216. Email: samuel.lara@ipicyt.edu.mx.

Palabras clave: G0S2, purificación, apoptosis.

Introducción. G0S2 es una proteína de 103 aminoácidos descrita por primera vez en células mononucleares donde se expresó de forma diferencial durante la transición del ciclo celular inducido por fármacos desde la fase G0 a la G1¹. Es una proteína multifacética que participa en diversos procesos celulares como la proliferación celular, lipólisis, producción de ATP, apoptosis, etc². Un análisis *in sillico* determinó que la proteína G0S2 de humano tiene un dominio hidrofóbico (HD) el cual se presume es la región más estructurada, así mismo se logró identificar que las regiones N- y C- terminal tienden a tener una estructura desordenada³. En este trabajo nos enfocamos en la participación de G0S2 en la apoptosis, donde al interactuar con Bcl-2 se libera la proteína Bax interrumpiendo la formación del heterodímero Bcl-2/Bax. La liberación de Bax da inicio al proceso de apoptosis inhibiendo la proliferación celular⁴. El objetivo de este trabajo es caracterizar la interacción molecular de las proteínas hG0S2 y hBcl-2 durante la formación del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante técnicas bioquímicas y biofísicas.

Metodología. Se realizó la clonación y expresión de las construcciones SUMO-hG0S2 y hBcl-2 en el vector pET28pps con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*. Posteriormente se continuó con la purificación de las construcciones mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA) y una segunda purificación por cromatografía por exclusión molecular (SEC), después se evaluó la interacción y formación del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante SEC y dispersión dinámica de luz (DLS). Además, se realizaron experimentos de cristalización del complejo hG0S2/hBcl-2 mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada.

Resultados. Se realizó exitosamente la clonación, expresión y purificación de cada una de las construcciones obteniendo 2.9 mg/L de hG0S2 y 9.6 mg/L de Bcl-2. La identidad de las proteínas fue confirmada por geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 17% (Fig. 1). Los experimentos de SEC (Fig. 2) mostraron que efectivamente existe una interacción muy estable entre ambas proteínas al formar el complejo hG0S2/hBcl-2, el cual tiene un peso de

48.9kDa, esto se confirmó mediante experimentos de DLS donde se obtuvo un peso de 34.4 kDa.

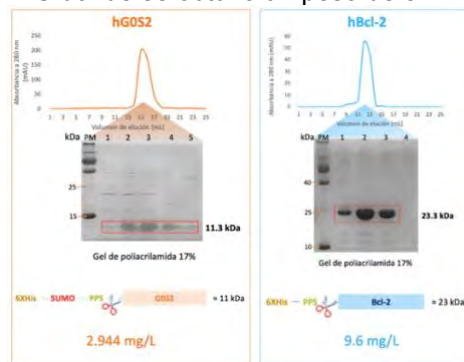


Fig. 1. Purificación por exclusión molecular de las proteínas hG0S2 y hBcl-2.

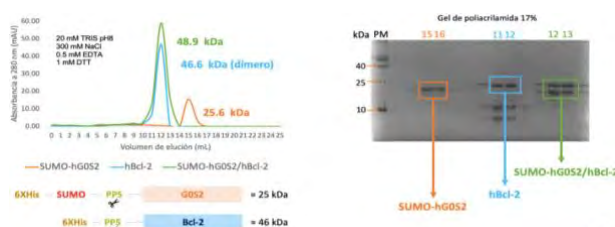


Fig. 2. Evaluación de la interacción del complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2.

Conclusiones. Las proteínas hG0S2 y hBcl-2 fueron expresadas exitosamente y se optimizó la purificación de ambas donde se logró obtener un rendimiento 2.9 mg/L y 9.6 mg/L respectivamente de producción total de proteína. El complejo SUMO-hG0S2/hBcl-2 se puede purificar por exclusión molecular y eluye en un solo pico lo que indica que la interacción entre ambas proteínas es estable.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP- CONACYT No CB2011-168710 y por el proyecto CONACYT INFRA-2013-01 No 204373.

Bibliografía. (1) Russell L, Forsdyke D. R. (1991) *DNA and Cell Biology*. Vol 10: 581-591. (2) Yang X, Lu X, Lombès M, Rha G B, Chi Y I, Guerin T M, Smart E J, Liu J. (2010) *Cell metabolism*. Vol 11: 194-205. (3) Páez E D, Llamas M L, Benítez C G, Montero G M, Lara S. (2020) *ACS omega*. Vol 5: 25841-25847. (4) Welch C, Santra M K, El-Assaad W, Zhu X, Huber W E, Keys R A, Teodoro J G, Green M R. (2009) *Cancer research*. Vol 69: 6782-6789.

UNIÓN DE Cu(II) A LA PROTEÍNA 6AJL2-R24G, ASOCIADA CON AMILOIDOSIS DE CADENA LIGERA. PAPEL DE LAS HISTIDINAS.

Fernanda Mata-Salgado¹, Angel Pelaez-Aguilar², Alan Morales-Ortiz¹, César Millán-Pacheco³, Clarita Olvera⁴, Nina Pastor^{1*}, Lina Rivillas-Acevedo^{1*}

¹Centro de Investigación en Dinámica Molecular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62210

²Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210

³Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62210

⁴Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210

Amiloidosis, agregación, interacción con Cu(II)

Introducción. La amiloidosis de cadena ligera (AL) es la forma más común de amiloidosis sistémica, esta enfermedad se caracteriza por el depósito extracelular de fibras amiloides formadas por fragmentos del dominio variable de cadenas ligeras de inmunoglobulina en diferentes órganos y tejidos. Se ha reportado que aproximadamente un 30% de los casos de AL contienen a la línea germinal $\lambda 6a$ y un 25% de éstos presentan una mutante donde la Arginina en la posición 24 es sustituida por una Glicina (R24G), haciendo a la proteína más amiloidogénica e inestable termodinámicamente. Poco se ha descrito sobre el papel de iones metálicos en el desarrollo de esta enfermedad, a pesar de existir abundante evidencia de su papel en otras enfermedades conformacionales. En nuestro grupo de trabajo se encontró que el Cu(II) se une a la proteína 6aJL2-R24G en dos sitios cercanos a las Histidinas de esta proteína. Esta interacción desestabiliza a la proteína y la hace más propensa a formar fibras amiloides.

Para conocer el mecanismo por el cual la interacción con Cu(II) hace a la proteína más amiloidogénica y menos estable térmicamente, en este trabajo se reporta el efecto de la unión del Cu(II) a las variantes H8S, Δ H99 y H8S/ Δ H99.

Metodología. Para estudiar el cambio en la estabilidad térmica de las mutantes y el efecto de la unión del Cu(II) a éstas se realizó desplegamiento térmico siguiendo la fluorescencia intrínseca del Trp 36⁽¹⁾. El cambio en la estructura secundaria se siguió mediante dicroísmo circular en la región UV-Vis⁽²⁾. La formación de fibras amiloides se siguió mediante fluorescencia de ThT⁽³⁾ y las muestras del punto final de las cinéticas se llevaron a microscopía de transmisión electrónica.

Resultados.

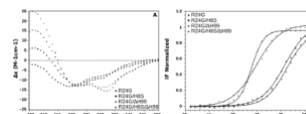


Fig. 1. Perturbación en la proteína R24G inducida por la sustitución de Histidinas. Comparación del espectro de CD (A) y el de desplegamiento térmico (B) entre la proteína 6aJL-R24G y variantes de histidina.

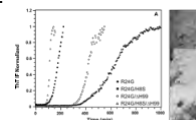


Fig. 2. Cinética de formación de fibras amiloides de las variantes de histidina. Cinética de agregación (A) y las imágenes de TEM (B) de R24G/H8S, R24G/ Δ H99, and H8S/ Δ H99.

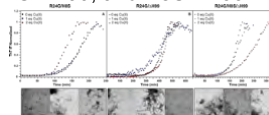


Fig. 3. Cinética de formación de fibras amiloides e imágenes de TEM de R24G/H8S, R24G/ Δ H99, and H8S/ Δ H99 y su interacción con Cu(II).

Conclusiones. La sustitución H8S hace a la proteína más amiloidogénica mientras que la delección de la H99 la hace menos estable térmicamente y la mutante doble tiene ambos efectos.

El Cu(II) se une a las histidinas 8 y 99 de la proteína 6aJL2-R24G y acelera la formación de fibras amiloides mediante un proceso cooperativo, es decir el efecto sólo ocurre si el Cu(II) se une a ambas histidinas.

Agradecimiento. Proyecto financiado por el Conacyt (A1-S22109)

Bibliografía.

- 1.- Goto Y, Hamaguchi K. 1979. *J Biochem.* 86(5):1433-41.
- 2.- McLaughlin RW, De Stigter JK, Sikkink LA, Baden EM, Ramirez-Alvarado M. 2006. *Protein Sci.* 15(7):1710-22.
- 3.- Gade Malmos K, Blancas-Mejia LM, Weber B, Buchner J, Ramirez-Alvarado M, Naiki H, Otzen D. 2017. *Amyloid.* 24(1):1-16.

OPTIMIZACIÓN BASADA EN LA ESTRUCTURA DE DERIVADOS DEL CARBENDAZIM
MEDIANTE CÁLCULOS DE ENERGÍA LIBRE

Luis Fernando Colorado-Pablo^a, Johan D. Espinosa-Mendoza^a, Lucía Cano-González^a, Félix Matadamas-Martínez^b, Ariana Romero-Velásquez^a, Miguel Flores-Ramos^c, Marco Antonio Cerbón-Cervantes^a, Rafael Castillo^a, Ignacio González-Sánchez^a, Lilián Yépez-Mulia^b, Alicia Hernández-Campos^a y Rodrigo Aguayo-Ortiz^a Email: rodaguayo@quimica.unam.mx

^aFacultad de Química, UNAM, CDMX 04510, México, ^bUnidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, CDMX 06720, México, ^cENES Unidad Mérida, UNAM, Yucatán 97357, México

Palabras clave: Anticancerígenos, bencimidazoles, β -tubulina

Introducción. Los derivados de carbendazim (CBZ), conocidos antiparasitarios de amplio espectro, han demostrado propiedades anticancerígenas al inhibir la polimerización de la tubulina. En este estudio, evaluamos el impacto en la energía libre de unión de las sustituciones en el CBZ mediante métodos alquímicos. Uno de los derivados estudiados destacó por su alta potencia contra células cancerosas de pulmón y colon. Este trabajo aporta ideas para el diseño de nuevos derivados de CBZ con potencial actividad anticancerígena.

Metodología. Se calculó la doble diferencia de energía libre $(\Delta\Delta G_{unión}^{LigA \rightarrow LigB} = \Delta G_{Prot}^{LigA \rightarrow LigB} - \Delta G_{Agua}^{LigA \rightarrow LigB})$ mediante la aproximación de Gapsys *et al.*, con la herramienta PMX. Adicionalmente, se llevaron a cabo tres simulaciones independientes de dinámica molecular de 5 complejos proteína-ligando por un tiempo de 200 ns cada una, utilizando GROMACS 2021. Los compuestos más prometedores se evaluaron contra líneas celulares SK-LU-1 y SW620. Asimismo, se realizaron pruebas de inmunofluorescencia en células SK-LU-1 y un ensayo de polimerización con el kit BK006P.

Resultados. Los resultados de energía nos permitieron identificar los sustituyentes con menor o mayor afinidad a la tubulina. Un valor de $\Delta\Delta G$ negativo indica que el cambio conduce a una mejora en la afinidad. Con base en el cálculo de energía libre de unión, se lograron identificar 7 compuestos con mayor afinidad por el sitio de los bencimidazoles. Los ensayos en líneas celulares demostraron la actividad antiproliferativa de algunos de estos compuestos. Sin embargo, la mayoría de estos mostraron una menor potencia que el nocodazol (NZ), por lo que fue necesario analizar su comportamiento en el sitio mediante dinámica molecular. Los resultados de las simulaciones de este y otros derivados bencimidazólicos muestran un comportamiento similar

en el sitio interactuando con los residuos β N165, β E198 y β V236, con excepción de los compuestos diseñados, los cuales pierden la interacción por puente de hidrógeno con este último residuo, lo que podría explicar la reducción en la afinidad por el sitio.

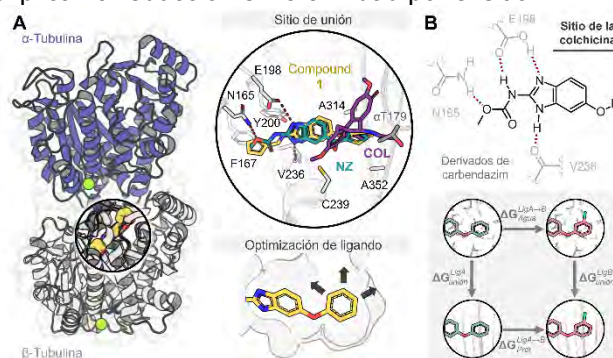


Fig. 1. (A) Heterodímero de α/β -tubulina destacando el sitio de unión de la colchicina en la β -tubulina y dirección de optimización de derivados de CBZ (B) Ciclo termodinámico para el cálculo de $\Delta\Delta G$ de unión.

Conclusiones. Este estudio permitió identificar derivados del bencimidazol con actividad antiproliferativa promisoría. No obstante, el tamaño las modificaciones realizadas podrían alterar interacciones intermoleculares clave para la unión de los ligandos. Resulta necesaria una mayor exploración hacia el incremento de la afinidad de los derivados de CBZ por la β -tubulina.

Agradecimiento. Agradecemos a la DGTIC por el apoyo con la supercomputadora "Miztli". A la DGAPA por el financiamiento (PAPIIT IA201022). A la USAII UNAM. L.C.-G (596643) y L.F.C.-P. (1265185) agradecen a CONAHCYT por la beca otorgada.

Bibliografía.

1. Son, D. *Cancers*. 2020. Vol (14): 4601.
2. Wang, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. Vol (17):4250-4253
3. Gapsys, V J. *Comput. Chem.* 2015. Vol (5): 348–354.
4. de la Roche, N. *Eur. J. Med. Chem.* 2022. Vol (241): 114614.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA LIPASA TA0887 PROVENIENTE DE *THERMOPLASMA ACIDOPHILUM*

Alejandro Delgado Rey¹, M. Leticia Santos Martínez¹ y Samuel Lara-González¹.

¹Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., División de Biología Molecular, San Luis Potosí, 78216, E-mail: samuel.lara@ipicyt.edu.mx.

Palabras clave: Lipasas termoestables, Ta0887, *Thermoplasma acidophilum*

Introducción. Las lipasas microbianas tienen una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas gracias a su alta actividad, estabilidad y especificidad en diversos entornos (1). *Thermoplasma acidophilum* es una fuente prometedora de lipasas termoestables con utilidad biotecnológica.

El proyecto busca caracterizar bioquímicamente y estructuralmente la lipasa Ta0887 de *T. acidophilum*, con el fin de identificar su propiedad biocatalítica principal para su aplicación en algún sector industrial.

Metodología. Se clonó y expresó heterológicamente el gen Ta0887 en *Escherichia coli* TOP10 y BL21 con el vector pET28pps. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad a Níquel e intercambio catiónico. Se realizaron ensayos de dispersión dinámica de luz para obtener información del tamaño, forma y estado oligomérico en solución. Se llevaron a cabo ensayos de cristalización mediante difusión de vapor en gota sentada. La estructura cristalográfica de Ta0887 se refinó, ajustó y validó con phenix.refine, COOT y MolProbity (2). Se realizaron ensayos de actividad enzimática utilizando ésteres de *p*-nitrofenil de distintas longitudes de cadena y midiendo el *p*-nitrofenol liberado a $\lambda = 410$ nm (3).

Resultados. El peso molecular teórico de Ta0887 es de 26.70 kDa. La proteína se expresó y purificó con éxito eluyendo de la columna HiTrap SP con 150 mM NaCl de media. Los ensayos de DLS determinaron que Ta0887 es un monómero en solución con un radio hidrodinámico de 4.69 nm, que corresponde a un peso molecular de 24.7 kDa. Además, se estimó una temperatura de agregación de 70 °C. Se colectaron datos de difracción de rayos-X a 1.96Å de resolución de cristales crecidos en 0.1 M HEPES-Na pH 7.5, 10% isopropanol y 20% polietilenglicol 4,000. Los valores finales de R_{free} y R_{work} después del refinamiento fueron de 0.2022 y 0.1772 (Fig. 1). Los ensayos preliminares de actividad mostraron una destacada liberación de *p*-nitrofenol con *p*-NP butirato, evidenciada colorimétrica y espectrofotométricamente. En condiciones estándar (30 minutos de reacción, pH 7.0, 25 °C y 0.002 mg de Ta0887 en 1 mL), la actividad específica de Ta0887 fue de 4.3 μ moles/min/mL con 2 mM *p*-NP butirato. Por su

parte, con *p*-NP laurato, *p*-NP miristato y *p*-NP palmitato, la actividad específica fue de 1.7, 0.2 y 0.9 μ moles/min/mL, respectivamente.

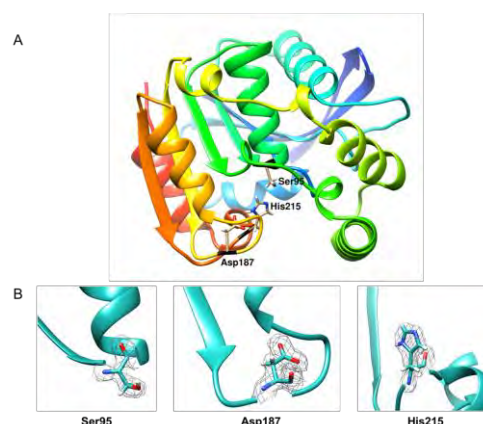


Fig. 1. Estructura cristalográfica de Ta0887 (A) y residuos catalíticos con su mapa de densidad electrónica asociado (B). Mapa 2mFo-DFc con densidad contorneada a 1.5 sigmas.

Conclusiones. Ta0887 es un monómero en solución y tiene una temperatura de agregación de 70 °C. Se obtuvieron cristales capaces de difractar a 1.96Å. La estructura cristalográfica resuelta de Ta0887 presenta el plegamiento α/β hidrolasa típico de las lipasas, con un sitio activo bien definido que sirve de base para diseñar mutantes puntuales. Los resultados preliminares de actividad sugieren que Ta0887 muestra preferencia por sustratos de cadena corta.

Agradecimiento. Al LANEM-IQ-UNAM, a la Dra. Adela Rodríguez-Romero y a la M. en C. Georgina Espinosa Pérez, por el apoyo en la colecta, reducción y análisis de los datos de difracción de rayos-X. Este proyecto fue financiado por el CONAHCYT, proyecto A1-S-26028.

Bibliografía.

- Casas-Godoy L, Gasteazoro F, Duquesne S, Bordes F, Marty A, Sandoval G. (2012) *Methods Mol Biol.* Vol (861): p. 3-38.
- Adams P, Afonine P, Bunkóczi G, Chen V, Davis I, Echols N, et al. (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* Vol (66):p. 213-221.
- Yang W, He Y, Zhang H, Yunjun Y. (2016) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* Vol (126).

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD INTERFACIAL DE LA HIDROFOBINA CLASE I DEL HONGO *Agaricus bisporus*.

Jesús Rojas¹, Hugo Nájera^{1*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Departamento de Ciencias Naturales. Laboratorio de Biofísicoquímica. Av. Vasco de Quiroga 4871. Col. Santa Fe Cuajimalpa, Ciudad de México. C.P. 05348. e-mail: jrojas@cua.uam.mx, hnajera@cua.uam.mx

Palabras clave: Hidrofobina, clase I, actividad interfacial

Introducción. Las hidrofobinas son pequeñas proteínas extracelulares anfífilas producidas por los hongos filamentosos, son proteínas activas de superficie, sus funciones están relacionadas principalmente por la capacidad de autoensamblarse en monocapas anfipáticas en interfaces hidrofóbicas-hidrofilicas (1). Se catalogan en las clases I y II, las hidrofobinas de clase I (Hfb-I) requieren un tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para poder disolver las estructuras estables llamadas varillas o "rodlets". Las de clase II no son capaces de producir varillas, por lo que se pueden disolver fácilmente con etanol y dodecilsulfato de sodio (SDS) (2). Por lo que el objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar la actividad interfacial de la hidrofobina de clase I a partir de *Agaricus bisporus*.

Metodología. Se cortó el sombrero de *Agaricus bisporus*, se congeló a -80 °C y se fragmentó en una licuadora, utilizando una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1 M + 1 % de SDS a pH 7 y 100 °C. El material se centrifugó, se lavó con agua destilada y se liofilizó. Al sombrero liofilizado se le adicionó con TFA, etanol y se secó. Después se disolvió en agua desionizada y se inyectó en una cromatografía de exclusión molecular (SEC), las fracciones se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE. Se determinó el ángulo de contacto sobre teflón y vidrio recubiertos con Hfb-I (7-785 µg/mL), la disminución de la tensión superficial y la concentración crítica micelar (CCM) se determinó por el método de gota pendiente. Los análisis de dicroísmo circular (DC) se llevaron a cabo vortexeando a la Hfb-I durante 2 min e incubando a 37 °C, pH 7 durante 240 min, se tomaron mediciones cada 15 min.

Resultados. En la Fig 1 se observa el cromatograma obtenido por SEC provenientes del sombrero (A), las fracciones 43-47 analizadas por SDS-PAGE presentan una banda de 14 kDa. (B)

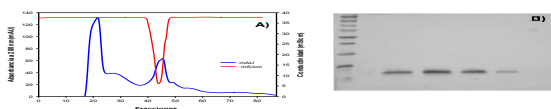


Fig. 1. Fraccionamiento de sombrero por SEC (A) y (B) SDS-PAGE de fracciones 43-47 de SEC y marcadores de peso molecular (M).

La Fig 2 representa la actividad superficial de Hfb-I sobre teflón y vidrio a diferentes concentraciones de proteína.

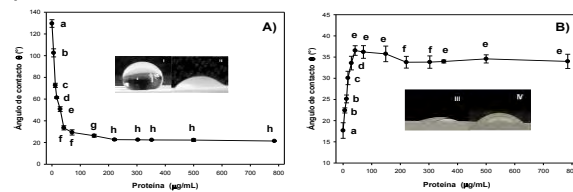


Fig. 2. Actividad superficial mediante medición del ángulo de contacto a diferentes concentraciones de Hfb-I en teflón (A) y vidrio (B). (I) Control-teflón, (II) Hfb-I-teflón, (III) Control-vidrio y (IV) Hfb-I-vidrio. Letras diferentes indican significancia ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey.

En la Fig 3A se muestra la determinación de la tensión superficial a diferentes concentraciones de Hfb-I, encontrando una CCM a 221 µg/mL. La Fig 3B representa el espectro de DC mostrando diferencias en los valores de elipticidad a 195, 208 y 222 nm durante el tiempo de incubación.

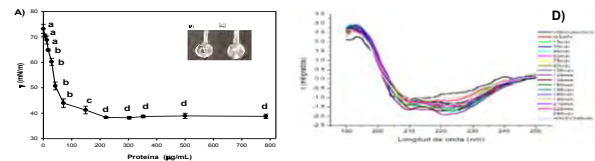


Fig. 3. Actividad superficial de Hfb-I determinada mediante el método de gota pendiente (A), gota de agua desionizada (B) y CCM (221 µg/mL) (C). Espectro de DC de Hfb-I determinado a pH 7 y 37 °C durante 240 min (D). Letras diferentes indican significancia ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey.

Conclusiones. La hidrofobina de clase I logró modificar superficies hidrofóbicas e hidrofílicas, además mostró cambios en su estructura secundaria (222 nm).

Agradecimiento. Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la estancia posdoctoral de JRO.

Bibliografía.

1. Wösten, H. A. (2001). *Annu. Rev. Microbiol.* 55 (1), 625-646.
2. Kulkarni, S., Nene, S., Joshi, K. (2017). *Process Biochem.* 61, 1-11.

IDENTIFICACIÓN PROTEÓMICA DE ENZIMAS DE ORIGEN MARINO COMO HERRAMIENTAS MOLECULARES CON APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Santos Ramírez-Carreto^a y Claudia Rodríguez-Almazán^{b*}

Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas,
Cuernavaca, Morelos, México, C.P. 62100
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad
de México, C.P. 04510

*claudiar@comunidad.unam.mx

Palabras clave: anémonas marinas, enzimas, proteoma

Introducción. En las últimas décadas se ha observado un aumento importante en la búsqueda de moléculas destinadas como herramientas moleculares en diversas áreas, como la biomedicina, biotecnología, nanotecnología, industria, entre otras¹. Los organismos marinos representan una fábrica de moléculas con potencial en diversas aplicaciones, tal es el caso de las anémonas de mar². En las bases de datos de transcriptomas y proteomas de estos organismos^{3,4} se reportan polipéptidos, que no necesariamente son componentes del veneno, y por sus características bioquímicas son candidatos relevantes para su aplicación en diversas áreas. En esta investigación realizamos el proteoma del extracto crudo de dos anémonas, *Anthopleura dowii* Verrill, 1869 y *Lebrunia neglecta* Duchassaing y Michelotti, 1860, con la finalidad de identificar polipéptidos para el desarrollo de nuevas herramientas moleculares.

Metodología. La colecta de organismos se realizó, en el caso de *A. dowii* en las costas de Ensenada, Baja California Norte, México, y *L. neglecta* se colectó en la zona arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. Los organismos se liofilizaron y se conservó la materia seca a -20°C hasta su uso. El extracto crudo se obtuvo hidratando el material liofilizado. La muestra se centrifugó, y el sobrenadante se filtró. La cuantificación de proteína fue por el método de Bradford. El perfil electroforético se realizó en geles SDS-PAGE, con 15% de acrilamida. El extracto crudo se analizó por proteómica de Shotgun. Las proteínas precipitadas se enviaron al Institute de Recherches Cliniques, Montreal, Canadá para su análisis por LC-MS/MS, usando un sistema de cromatografía líquida con el sistema Easy-nLC II. La identificación de proteínas se realizó mediante el programa Mascot Daemon v2.1 (Matrix.Science, London UK).

Resultados. Los extractos presentaron diferencia en la composición de polipéptidos con pesos moleculares que van de 10 a 250 kDa. Mediante LC-MS/MS se identificó un total de 120 proteínas en *A. dowii*, y 159 proteínas para *L. neglecta*, de las cuales, ambas

anémonas tienen en común 78 proteínas. Para la identificación de las proteínas se utilizó la base de datos Refseq del phylum Cnidaria, al que pertenecen las anémonas. Para el análisis de las secuencias se usó la base de datos del transcriptoma de *A. dowii*, en conjunto con la base UniProt (Swiss-Prot, mediante la herramienta BLASTP). De los resultados obtenidos se identificaron, para ambos extractos, proteínas como superóxido dismutasa, tioredoxinas, proteínas que responden al choque por calor, proteínas que participan en el plegamiento de proteínas, quitinasa tipo glicosidasas, proteínas de adhesión, y enzimas que participan en la ruta del metabolismo central, entre otras. Los datos demostraron un aumento en la expresión de enzimas oxidoreductasas, proteínas que participan en el plegamiento de proteínas, y en el metabolismo redox. Asimismo, se identificó un número menor de proteínas relacionadas con el estrés, enzimas tipo hidrolasas, en *L. neglecta*, con respecto a *A. dowii*.

Conclusiones. En extractos crudos de anémonas de mar se identificaron enzimas con gran potencial para una aplicación biotecnológica.

Agradecimiento. Proyecto IT200819 otorgado por PAPIIT-DGAPA-UNAM. Presupuesto personal-ICAT-UNAM

Bibliografía.

1. Bjoern M von Reumont, Gregor Anderlueh y colaboradores (2022) Modern venomomics—Current insights, novel methods, and future perspectives in biological and applied animal venom research. *GigaScience*, 11, 1–27.
2. Frazão, B.; Vasconcelos, V.; Antunes, A. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: An overview. *Mar. Drugs* 2012, 10, 1812–1851.
3. Jason Macrander, Michael Broe, Marymegan Daly (2016) Tissue-Specific Venom Composition and Differential Gene Expression in Sea Anemones. *Genome Biol Evol.* 8(8): 2358–2375.
4. Ramírez-Carreto, S.; Pérez-García, E.I.; Salazar-García, S.I.; Bernáldez-Sarabia, J.; Licea-Navarro, A.; Rudiño-Piñera, E.; Pérez-Martínez, L.; Pedraza-Alva, G.; Rodríguez-Almazán, C. Identification of a pore-forming protein from sea anemone *Anthopleura dowii* Verrill (1869) venom by mass spectrometry. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2019, 25, e147418.

MODELAJE DEL CANAL TRPV1 PARA LA IDENTIFICACION DE NUEVOS LIGANDOS MEDIANTE CRIBADO VIRTUAL

Juan David Bermudes Contreras¹, Alondra Cisneros Sarabia¹, María Esther Ramirez-Moreno¹, Absalom Zamorano Carrillo¹, José Luis Acosta Rodriguez², Laurence A. Marchat¹

¹Instituto Politécnico Nacional, ENMH, Guillermo Massieu Helguera 239, Fracc. La Escalera, Ticomán, Alc. Gustavo A. Madero, Ciudad de México, CP 07320

juan_david_bermudes@hotmail.com

²CIIDIR-Sinaloa, IPN, Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes, San Joachin, CP 81107, Guasave, Sinaloa, México.

Palabras clave: TRPV1, obesidad, ligandos

Introducción. TRPV1, el canal de potencial transitorio vaniloide (TRPV por las siglas en inglés) más estudiado, regula eventos relacionados con el dolor nociceptivo, además esta implicado en vías moleculares relacionadas con la adipogénesis (1), un proceso desregulado en la obesidad, esta pandemia que representa un grave problema de salud. Por lo que, TRPV1 representa un blanco farmacológico atractivo para el tratamiento de esta patología. Congruentemente, algunos trabajos han mostrado el efecto benéfico de ligandos del TRPV1 para el control de la adipogénesis (2). Por lo que este trabajo se centra el modelaje del TRPV1 humano para la identificación de nuevos ligandos mediante cribado virtual.

Metodología. Se realizó el modelaje del TRPV1 en su forma monomérica y tetramérica con I-Tasser, UCSF-Chimera, Procheck y MolProbity. Se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular (100 ns) con GROMACS para obtener modelos representativos a 310 K y 400 K. Se utilizaron los programas AutoDock Vina y MOE para realizar el acoplamiento molecular dirigido al bolsillo vaniloide en la quimioteca ChemBridge. Finalmente, se realizó la predicción de las propiedades ADMET de los compuestos seleccionados usando SwissADME, admetSAR 2.0 y PROTOX-II.

Resultados

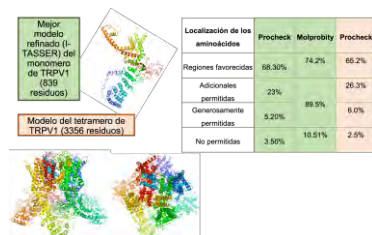


Fig. 1. Predicción de la forma monomérica y tetramérica del TRPV1.

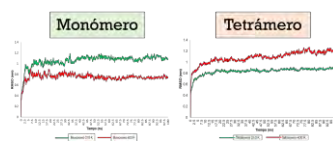


Fig. 2. Analisis de los valores de RMSD de la forma monomérica y tetramérica del TRPV1 durante los 100 ns de la simulación de dinámica molecular.

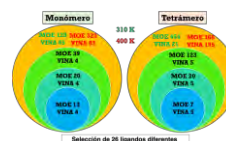


Fig. 3. Selección y filtrado de los ligandos de TRPV1 en su forma monomérica y tetramérica. Se realizó el acoplamiento molecular dirigido al bolsillo vaniloide con los programas Moe (M) y AutoDock Vina (V) usando la quimioteca ChemBridge.

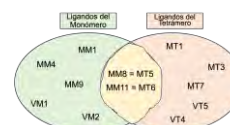


Fig. 4. Selección de 12 moléculas con de las propiedades ADMET-Tox seguras.

Conclusiones. 1. Se obtuvo el modelo de TRPV1 monomérico y tetramérico. 2. La formación del tetramero estabiliza el TRPV1. 3. Un total de 26 moléculas cumplieron con los criterios de filtrado: complejo con ΔG menor que los agonistas conocidos; moléculas seleccionadas con ambos modelos a 310 K o 400 K; top 20 de las moléculas. 4. Solamente 12 compuestos fueron predichos como seguros, y se evaluarán *in vitro*.

Agradecimiento. SIP20210843, SIP20220687, SIP20230858.

Referencias. 1. Morales-Martínez, C.E., Márquez-Aguirre, A.L., Díaz-Martínez, E., et al. (2016). *Med chem* (Los Angeles) 6: 365-371. 2. Hochkogler C.M., Lieder, B., Rust, P., et al., (2017). *Mol Nutr Food Res.* 61(5).

FUNCIONALIZACIÓN DE VLP DEL BACTERIÓFAGO P22 CON PÉPTIDOS BIOMIMÉTICOS PARA ENTREGA DIRIGIDA EN LÍNEAS CELULARES

Jusseth Torres Miranda, Andrés Zárate Romero, Ana Guadalupe Rodríguez Hernández, Centro de Nanociencias y Nanotecnología departamento de Bionanotecnología, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Ensenada B. C. 22760, jusseth@cicese.edu.mx

Palabras clave: VLP, P22, péptidos,

Introducción. Las VLP, o partículas similares a virus, son nanopartículas de proteínas autoensamblables, las cuales se encuentran basadas en cápsides virales. Estas cápsides pueden ser modificadas de forma genética para añadir secuencias de proteínas y/o péptidos con diferentes fines (1). Las modificaciones se pueden emplear para diseñar VLP que sean dirigidas a un objetivo específico, mediante el uso de péptidos, en el caso de este proyecto, los péptidos P12 y CREKA, los cuales son específicos para células de cáncer de próstata y coágulos de fibrina, respectivamente (2,3). Un tipo de VLP, son las VLP P22 basadas en el fago P22, de alrededor de 58 nm. Éstas VLP pueden modificarse en el extremo C-terminal de la proteína de capa CP, sin afectar el ensamble de la cápside (1). Por lo anterior, este trabajo consiste en desarrollar VLP P22 en las cuales se tengan fusionados de forma genética a la CP, los péptidos P12 y CREKA, y una proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a la proteína de andamiaje (SP), de tal forma que las VLP P22 se encuentren dirigidas a líneas celulares específicas y su ubicación se pueda determinar empleando la fluorescencia de GFP.

Metodología. Las secuencias de P12 y CREKA se fusionaron al C-terminal de CP, y GFP se fusionó a SP, mediante PCR (1). Las VLP P22 fueron luego expresadas en *E. coli* BL21 (DE3) y purificadas mediante dos etapas, la primera por ultracentrifugación en un colchón de sacarosa y la segunda por cromatografía de exclusión por tamaño (4).

Resultados. Se obtuvieron VLP P22 con diferentes CP, esto es VLP P22 CPwt (sin modificaciones en la CP), VLP P22 CPP12 y VLP P22 CPCREKA. Los tamaños analizados en TEM indican que las partículas tienen un tamaño correspondiente a lo previamente reportado, siendo diámetros de 65.23 ± 10.37 nm, 64.87 ± 7.56 nm y 54.89 ± 6.44 nm, para VLP P22 CPwt, CPP12 y CPCREKA. En la Figura 1 se muestran las micrografías de TEM de las VLP P22 obtenidas. En donde se pueden observar tanto estructuras homogéneas, con la morfología esférica esperada, como estructuras aberrantes, donde se observan morfologías diferentes y se encuentran incluso dobles

capas. La formación de estas estructuras aberrantes se atribuye a la expresión de las proteínas de la cápside, donde la SP se expresó en un nivel considerablemente menor que CP. En la Figura 1D se muestra el espectro de fluorescencia correspondiente a GFP, donde se puede observar que las VLP P22 obtenidas presentan una señal de fluorescencia.

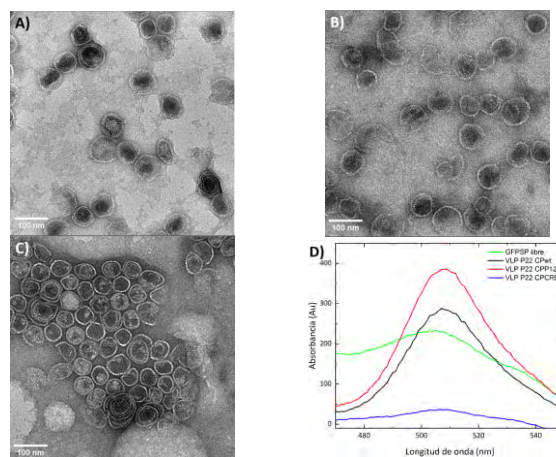


Fig. 1. Micrografías de las VLP P22 obtenidas, correspondientes a VLP P22 CPwt (A), VLP P22 CPP12 (B), VLP P22 CPCREKA (C), la barra de escala se encuentra a 100 nm; y espectro de fluorescencia de las VLP P22 obtenidas comparadas con GFPSP libre (D).

Conclusiones. Se lograron obtener VLP P22 con la CP fusionada a péptidos, las cuales presentaron un tamaño y morfología similar a lo previamente reportado. Sin embargo, la presencia de cápsides aberrantes sigue siendo un problema, el cual se puede deber a las diferencias de expresión de las proteínas que forman a la VLP.

Agradecimiento. Jusseth Torres Miranda agradece a CONAHCYT por la beca de maestría otorgada.

Bibliografía.

- Kim, B., Tullman-Ercek, D. 2022. *Curr Opin Biotech*, 116, 2843-2851.
- Bashari, O., Redko, B., Cohen, A., Luboshits, G., Gellerman, G., Firer, N. A. (2017). *Cancer Lett*, 408, 164-173.
- Ando, M., Fujimoto, M., Takashi, Y., Nishikawa, M., Hamana, A., Takakura, Y. (2017). *J Pharm Sci*, 106, 892-897.
- Sánchez-Sánchez, L., et al. (2015). *J Biotechnol*, 13 (66), 1-10

BÚSQUEDA DE SITIOS DE UNIÓN A LIGANDOS EN LA PROTEÍNA FABP4 POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

M. Fernanda Huerta-Anguiano¹, Gabriela M. Montero-Morán², F. Elihú Bautista-Redonda¹, & Samuel Lara-González¹

¹ División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. San Luis Potosí, 78126, San Luis Potosí, S.L.P. ² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 78210. E-mail: samuel.lara@ipicyt.edu.mx

Palabras clave: FABP4, obesidad, fármacos

Introducción. La proteína FABP4, abundante en tejido adiposo, desempeña un papel crucial en el transporte de ácidos grasos y la respuesta inflamatoria¹. Esta proteína se ha relacionado con aterosclerosis, resistencia a la insulina y otras patologías². Al inhibir a la proteína o eliminar el gen, se genera protección y mejoría en afecciones relacionadas a obesidad, por lo que hay gran interés en el desarrollo de un fármaco inhibidor². Sin embargo, la gran similitud estructural que tiene FABP4 con los otros miembros de su familia proteica dificulta el diseño de un fármaco específico³. El objetivo del trabajo es buscar nuevos sitios de unión a ligandos para FABP4, evaluando compuestos naturales con el fin de desarrollar inhibidores terapéuticos selectivos.

Metodología.

Expresión y purificación: Se indujo la expresión del gen *FABP4* con IPTG en *E. coli* BL21 (DE3) Star y se purificó la proteína, por cromatografía de afinidad a Ni, intercambio iónico y finalmente cromatografía de exclusión molecular. **Ensayos de afinidad a FABP4:** Se compuestos naturales como ligandos de FABP4 por un ensayo de desplazamiento por competencia con el fluoróforo 1,8-ANS a FABP4 y se determinó la IC₅₀. **Cristalización:** Se empleó el método de difusión de vapor en gota sentada para la formación de cristales de proteína FABP4. Para la formación de complejos de proteína-ligando se empleó el método de "soaking". Se realizó reemplazo molecular para determinar las estructuras y fueron validadas con Molprobit. **Acoplamiento molecular:** Por último, se realizó un acoplamiento molecular de FABP4 con los compuestos naturales utilizando Autodock Vina.

Resultados. En este estudio se determinó la afinidad de compuestos naturales hacia FABP4, destacando los compuestos Nuchensin (IC₅₀ 0.16 ± 0.02 mM) y Linearolactone (IC₅₀ 0.33±0.15mM) como los que mejor se unen a FABP4. Con el Acoplamiento molecular de estos compuestos hacia FABP4 se lograron detectar interacciones nuevas de puentes de hidrógeno hacia residuos Tyr20, Thr61, Arg107 y Glu73, así como sitios únicos de unión Val24 y Ser54.

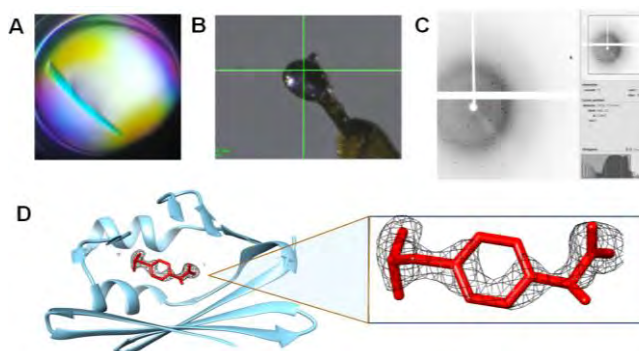


Fig. 1. Cristalografía del complejo de proteína FABP4-ibuprofeno. **A.** Cristal de apoproteína de FABP4. **B.** Cristal de proteína congelado con nitrógeno líquido y posicionado para su difracción. **C.** Patrón de difracción de FABP4. **D.** Estructura de FABP4 con ibuprofeno rodeado por su densidad electrónica. Mapa 2mFo-DFc a 1.38 sigma.

Conclusiones. Esta es la primera vez que se han evaluado compuestos purificados de la planta *S. amarissima* como ligandos de FABP4. Se lograron estandarizar los métodos de cristalización y el de desplazamiento de 1,8-ANS, utilizando como control a S-Ibuprofeno. Se evaluaron los compuestos naturales 2, 3, 4, 10 y 16 en un ensayo *in silico* de acoplamiento molecular, y se encontraron uniones en sitios únicos de FABP4 (Val24 y Ser 54). Continuaremos buscando más ligandos de diferentes fuentes que se unan a residuos específicos de FABP4 para el diseño de una molécula con alta especificidad y afinidad.

Agradecimiento. Al LANEM-IQ-UNAM, a la Dra. Adela Rodríguez-Romero y a la M. en C. Georgina Espinosa Pérez, por el apoyo en la colecta, reducción y análisis de los datos de difracción de rayos-X. Este trabajo fue financiado por el CONAHCYT, proyecto INFRA 204373 y CB 168710. MFHA recibió una beca académica #931883 por CONAHCYT.

Bibliografía.

1. Tagami, U., Takahashi, K., Igarashi, S., Ejima, C., Yoshida, T., Takeshita, S., ... Mizukoshi, T. (2016). ACS Med. Chem. Lett. 7(4): 435-439.
2. Burak, M. F., Inouye, K. E., White, A., Lee, A., Tuncman, G., Calay, E. S., ... Hotamisligil, G. S. (2015). Sci. Transl. Med. 7(319).
3. Venkatachalam, A. B., Fontenot, Q., Farrara, A., Wright, J. M. (2018). Comp. Biochem. Physiol.: 19-25.

Identificación de potenciales inhibidores de Ts24GST clase sigma de *Taenia solium* mediante cribado virtual con *ensemble docking*

Lluvia de C. Sánchez Pérez¹, César Sánchez¹, Ponciano García Gutiérrez¹, Abraham Landa², Rafael A. Zubillaga Luna¹. ¹Departamento de Química. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, C.P 09340, México. ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, C.P 04510, México. lluviaceae@gmail.com

Palabras clave: GST, sigma, inhibidores, cribado

Introducción. Las glutatión transferasas (GST) son el principal sistema de desintoxicación de fase II de helmintos pues reducen la toxicidad de compuestos xenobiótico (1)). Convirtiéndolas es un blanco atractivo para el diseño de fármacos antihelmínticos (2). El objetivo de esta investigación fue identificar moléculas con potencial efecto inhibitor sobre la Ts24GST mediante cribado virtual.

Metodología. El modelo 3D de Ts24GST se construyó mediante modelado por homología con AlphaFold2, empleando las secuencias con el mayor porcentaje de identidad con código PDB: 2bw9 y 2c80. La calidad del modelo se verificó con el servidor Saves6.0 y el diagrama de Ramachandran. Posteriormente se construyó el complejo Ts24GST-GSH, que fue sometido a una simulación de 500 ns, con tres repeticiones en GROMACS 2019.2. Las trayectorias obtenidas se agruparon jerárquicamente en cuatro clústeres con TtClust (3), y se escogió la conformación más representativa de cada uno. Se identificaron potenciales sitios de unión de ligandos empleando DoGSiteScorer y SILCS (4) que consistió en tres DM de 100 ns del complejo con solvente mezclado agua/propanol (sonda). Los sitios se escogieron en función del de ΔG_{grid} en SILCS y su conservación con GSTs sigma de humanos. Con las cuatro conformaciones y el sitio elegido se hizo un Ensemble Docking de tres etapas, empleando la quimioteca Discovery Diversity Set de Enamine y con los programas AutoDock VINA y GOLD.

Resultados.

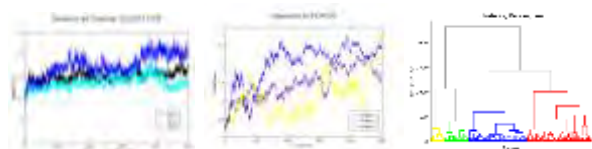


Fig. 1. Cálculo de RMSD del complejo Ts24GST-GSH a 500 ns de simulación, se observa un comportamiento estable y similar en las 3 réplicas (A). RMSD de las simulaciones con TS24GST sola, muestran valores significativamente altos consecuencia de múltiples fluctuaciones en su movimiento, es por tanto menos estable (B).

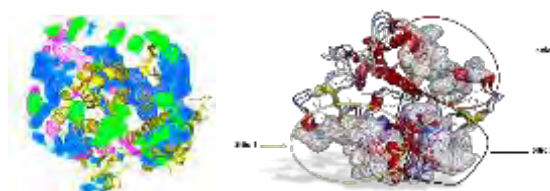


Fig. 2. Puntos críticos de interacción del propanol a 3 Å de la Ts24GST en las tres repeticiones (C). Identificación de tres potenciales sitios de unión de ligandos en el complejo (D).

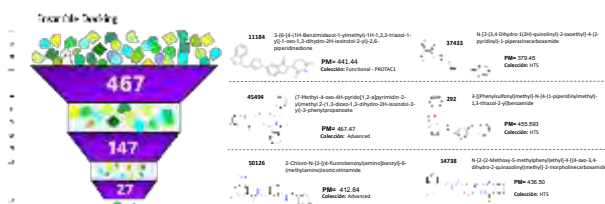


Fig. 3. Resultados del cribado virtual por etapa, sobre el sitio seleccionado (E). características de 6 de los 27 compuestos identificados, que se probarán in vitro sobre la Ts24GST recombinante

Conclusiones. En las simulaciones la unión a GSH estabiliza la proteína, coincidiendo con el comportamiento teórico y experimental reportado (5). Con este complejo, se identificó un potencial sitio de unión, que fue empleado en un cribado virtual, del que se obtuvieron 27 compuestos, para evaluar su capacidad inhibitoria en la Ts24GST recombinante.

Agradecimiento.

Al CONAHCYT, por el apoyo financiero al proyecto CF19-7397 y la beca otorgada para realizar la estancia posdoctoral de LCSP (CVU 467703).

Bibliografía.

- 1.-Torres-Rivera A y Landa A. 2008. Acta Trop. 105(2): 99–112.
- 2.- García-Gutiérrez P, Zubillaga R A, Téllez-Plancarte A, Flores-López R, Camarillo-Cadena M, Landa M. 2020. J. Mol. Graph. Model 100: 107707.
- 3.-Tubiana T, Carvillio J C, Boulard Y, Bressanelli S. 2018. J. Chem. Inf. Model. 58, 2178–2182.
- 4.- Priyanka Prakash P, Hancock J F, Gorfe A A. 2015. Proteins 83:898–909.
- 5.- Danielson U H, Esterbauer H, Mannervik B. 1987. *Biochemical Journal* . 247(3): 707-713

DESARROLLO DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS Y DE ALTA AFINIDAD PARA LA GLUTATIÓN TRANSFERASA DE 26 kDa DE *Taenia solium*.

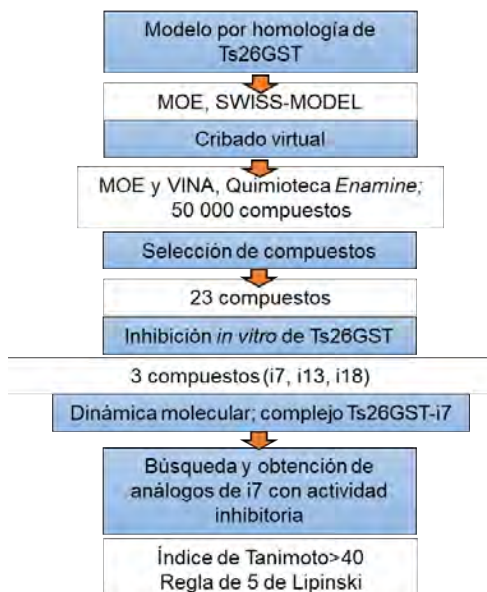
Roberto Flores-López¹, Ponciano García Gutiérrez², Abraham Landa Piedra¹, Rafael A. Zubillaga², Cesar Sánchez Juárez², Ricardo Miranda¹.

¹Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, C.P 04510. robertof@comunidad.unam.mx correo. ²Departamento de Química, UAM-Iztapalapa, Ciudad de México, C.P 09340

Palabras clave: Descubrimiento de fármaco, modelado molecular, inhibición selectiva

Introducción. La cisticercosis es una enfermedad causada por la larva de *Taenia solium*. Puede dañar cualquier órgano, provocando neurocisticercosis en su forma más grave al afectar el sistema nervioso central (1). *T. solium* ha desarrollado mecanismos para evadir las defensas del hospedero, tales como la producción de enzimas desintoxicantes (2). Las glutatión transferasas constituyen el principal sistema desintoxicante en los cestodos, y además participan en el transporte de moléculas, la síntesis de leucotrienos, prostaglandinas, y la señalización (3). En *T. solium* se han caracterizado tres clases de GST: una Sigma de 24.3 kDa (Ts24GST), una Mu de 25.5 kDa (Ts25GST), y una Alfa-Mu de 25.9 kDa (Ts26GST) (4). Nuestro grupo ha identificado inhibidores para la Ts26GST por cribado virtual y por ensayos enzimáticos *in vitro* (5). El objetivo de nuestro trabajo es desarrollar un fármaco para tratar la cisticercosis humana.

Metodología.



Resultados. Se identificó un sitio de unión no conservado en la Ts26GST, y se identificó un inhibidor acompetitivo con inhibición del 70 % de la actividad. De acuerdo con la dinámica molecular, i7 afecta la conformación estructural de Ts26GST por la pérdida de interacciones puentes de hidrogeno. Además, se identificaron inhibidores análogos de i7.

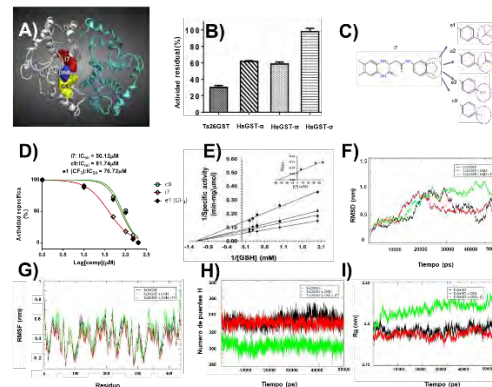


Fig. 1. A) modelo del complejo Ts26GST-GSH-CDNB-i7. B) Inhibición de Ts26GST y GST humana. C) estructura de i7 y cambios en sus análogos. D) IC₅₀ de inhibidores. E) Mecanismo de inhibición de i7. F) RMSD, G) RMSF, H) puentes de H y I) radio de giro con i7.

Conclusiones. Se logró inhibir a la Ts26GST y en menor grado a la HsGST-α. Se obtuvieron nuevos inhibidores por similitud estructural.

Agradecimiento. Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, Mitzli de la Dirección de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación de la UNAM, a Yoltla del Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo de la UAM-Iztapalapa. Esta investigación fue financiada por el CONAHCYT, proyecto CF19-7397 y la beca de posgrado con CVU 763380

Bibliografía.

1. Del Brutto O. Garcia H. (2005). *J. Trop. Med. Hyg.* 72, 3–9
2. Vibanco-Pérez, L. Jiménez, G. Mendoza-Hernández, A. Landa. (2002). *Parasitol Res.* 88, 398– 404
3. Torres-Rivera A, Landa A, (2008). *Arch of Biochem and Biophys.* 477, 372-378
4. Torres-Rivera, A., & Landa, A. (2008). *Act. trop.* 105(2), 99–112
5. García-Gutiérrez, P., Zubillaga, R. A., Téllez-Plancarte, A., Flores-López, R., Camarillo-Cadena, M., & Landa, A. (2020). *J Mol Graph Model.* 100, 107-707.

BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS BASADOS EN MUTANTES DE LA ARG181 DE LA LACTATO OXIDASA DE *AEROCOCCUS VIRIDANS*

Irma Yomira Palomares Ruiz, David Morales Gutiérrez, Raul García Morales, Andrés Zárate Romero, Centro de Nanociencias y Nanotecnología UNAM^a, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada^b, Ensenada B. C. 22760, ypalomares@cicese.edu.mx

Palabras clave: Lactato oxidasa, biosensores, Mutantes.

Introducción. La enzima L-lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* (AvLOx) es usada en biosensores electroquímicos de lactato, un metabolito de importancia para el monitoreo de la salud, del rendimiento físico y el control de procesos industriales [1]. En los biosensores de segunda generación, el intervalo de detección es limitado, impidiendo la detección precisa de las altas concentraciones de L-lactato presentes en el sudor bajo condiciones de ejercicio [2,3]. Por otro lado, el desarrollo de un biosensor de tercera generación (transferencia directa de electrones) para la glucosa oxidasa de *A. niger* mediante la formación de nanocables de platino, presenta una alternativa que se puede aplicar a la AvLOx al ser también una flavoenzima [4,5]. En este proyecto se diseñaron mutantes de la R181 de la AvLOx para permitir la formación de nanocables de platino. La caracterización enzimática de las mutantes mostró baja afinidad por lactato, una cualidad deseable para la detección de altas concentraciones de L-lactato en sudor en biosensores de segunda generación.

Metodología. Se diseñaron tres mutantes de la enzima AvLOx para ampliar el canal del sitio activo mediante la mutación *in silico* de la R181 (R181A, R181V y R181I). El diámetro del canal modificado se evaluó usando el servidor MOLE. Las enzimas silvestres y mutantes se expresaron en *E. coli* BL21 (DE3) y se purificaron mediante cromatografía de afinidad a níquel. Se evaluó la capacidad de las enzimas para reducir un precursor de platino (K_2PtCl_6) mediante DLS [4]. La enzima se inmovilizó con quitosano en bioelectrodos de segunda generación, utilizando una matriz de papel carbón y el mediador azul de Prusia [1].

Se fabricaron bioelectrodos de tercera generación en ausencia de oxígeno utilizando un electrodo de papel carbón. Se depositó una mezcla de K_2PtCl_6 y L-lactato, seguida de una solución de AvLOx [5].

Se analizó el rendimiento electroquímico de los electrodos empleando un potencióstato μ stat 400 de Metrohm DROPSSENS.

Resultados. Se determinaron parámetros cinéticos de las enzimas purificadas, la k_{cat} disminuyó a valores

cercanos a 0.1 s^{-1} a 0.13, 0.10 y 0.07, mientras que la K_M se incrementó a 0.80, 29.97 y 85.71 mM respectivamente para las mutantes R181V, R181A y R181I. Al evaluar la capacidad para formar nanopartículas de Pt por DLS, se observó la presencia de partículas mayores a 500 nm en las mutantes, mientras que para la silvestre solo se observó un pico de 10 nm. La formación de nanocúmulos de platino se confirmará por TEM. Los bioelectrodos de tercera generación no mostraron un aumento en la corriente, lo que podría deberse a problemas de ensamblaje o una formación deficiente de nanocables en la enzima mutante.

Los bioelectrodos de segunda generación basados en AvLOx WT mostraron un rango lineal de detección de 0.1-3 mM con una sensibilidad de $135.32\ \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ y un límite de detección de $24.32\ \mu\text{M}$. La mutante R181I, presentó un rango lineal de 1-200 mM, con una sensibilidad de $15.92\ \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ y un límite de detección de $591.09\ \mu\text{M}$.

Conclusiones. El cambio en la afinidad de la mutante R181I amplía los rangos de detección de lactato. Esto mejora la monitorización en biosensores de segunda generación. Se requiere evaluar la presencia de nanocúmulos de Pt en los electrodos de tercera generación por SEM, para mejorar el diseño del biosensor.

Agradecimiento. Irma Yomira Palomares Ruiz agradece al CONAHCyT por la beca de maestría otorgada.

Bibliografía.

1. García, R., Zárate, A., Wang, J., Vázquez, R. (2023). ChemElectroChem.1 -9
2. Hiraka, K., Kojima, K., Tsugawa, W., Asano, R., Ikebukuro, K., Sode, K. (2020). Biosensors and Bioelectronics. Vol. 151.
3. Stoisser T., Brunsteiner M., Wilson D. & Nidetzky B. (2016). Scientific Reports. Vol. 6.
4. Morales, D. (2022). (Tesis para obtener el grado Maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Maestría en Ciencias en Nanociencias
5. Trifonov, A., Stemmer, A., Tel-Vered, R. (2019). Nanoscale Advances. Enzymatic self-wiring in nanopores and its application in direct electron transfer biofuel cells. Vol. 1. Pp 347-356.

ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EhPC4 y EhCFIm25 de *Entamoeba histolytica*

Alondra Cisneros Sarabia¹, César A. Reyes López¹, Juan David Ospina Villa², Laurence A. Marchat¹

¹Instituto Politécnico Nacional, ENMH, Ciudad de México, México, CP 07320

²Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Antioquia, Colombia, CP 055450
acisneross1903@alumno.ipn.mx.

Palabras clave: EhPC4, interactions, Entamoeba

Introducción. En humano, el coactivador positivo 4 (PC4) participa en diferentes etapas de la producción del RNAm, incluyendo la transcripción y el corte/poliadenilación en el extremo 3' del pre-RNAm. De manera particular, en *Entamoeba histolytica* (el parásito causante de la amibiasis humana), PC4 tiene un papel importante en su virulencia (1). Además, a través de ensayos *in vitro* se observó que interactúa con la proteína EhCFIm25 (datos no publicados), la cual se une a la secuencia GUUG del extremo 3' del pre-RNAm y participa en la selección del sitio de corte/poliadenilación (2). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar los aminoácidos (aa) que participan en la interacción entre las proteínas EhPC4 y EhCFIm25.

Metodología. El modelo 3D de EhPC4 obtenido en RAPTOR X se sometió a una simulación de dinámica molecular por 500 ns (GROMACS), de los cuales se obtuvieron cinco estructuras representativas a través de gmx cluster. El acoplamiento molecular entre las estructuras seleccionadas de EhPC4 y el modelo previamente obtenido de EhCFIm25 (3) se realizó en LZERD y para identificar los aa que participan en su interacción se utilizó LigPlot+.

Resultados.

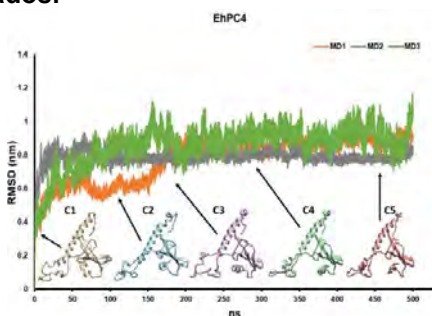


Fig. 1. Raíz de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) de la simulación de dinámica molecular de EhPC4. Triplicado de la SDM de 500 ns de EhPC4. C1, C2, C3, C4 y C5 son estructuras representativas de diferentes clústers obtenidos de la simulación de dinámica molecular.

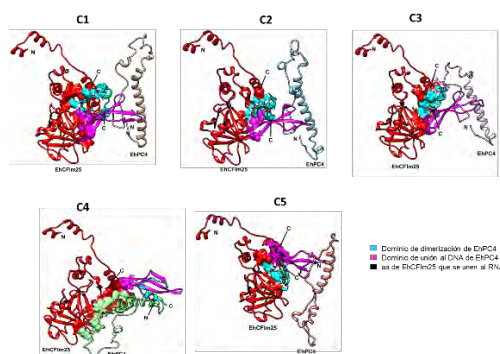


Fig. 2. Acoplamientos moleculares entre las estructuras seleccionadas de EhPC4 y EhCFIm25.

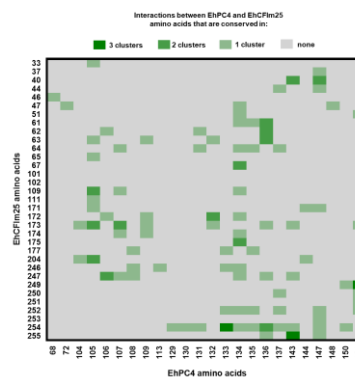


Fig. 3. Interacciones entre EhPC4 y EhCFIm25 que se conservan en los acoplamientos moleculares con las estructuras C1, C2, C3 y C5.

Conclusiones. 1. Se obtuvieron cinco estructuras representativas de la dinámica molecular de EhPC4. 2. Las estructuras C1, C2, C3, C4 y C5 no se unen al sitio de unión al RNA de EhCFIm25. 3. Los aa de EhPC4 que interactúan con EhCFIm25 se encuentran en el dominio de dimerización y de unión al DNA.

Agradecimiento. Proyecto CONAHCyT 285467.

Referencias. 1. Cruz, O., Marchat, L., Guillén, N. *et al.*, (2016). *Sci Rep.* 6(1): 19611. 2. Ospina-Villa, J.D., Dufour, A., Weber, C. *et al.*, (2018). *Sci Rep.* 8(1): 5720. 3. Ávila-Bonilla, RG., Velázquez Guzmán, J.A., Reyes-Zepeda, E. I., *et al.*, (2023). *Biosci Rep.* 43(2): BSR20221911.

LABORATORIO UNIVERSITARIO DE PROTEÓMICA

Lorena Hernández Orihuela, Erika P. Meneses Romero, Miguel Lara Flores, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca. Mor., 62210, <http://lnatcg.unam.mx/lup/index.html>
unidad.proteomica@ibt.unam.mx

Palabras clave: Proteómica, espectrometría de Masas, Análisis Informáticos



Fue creado en junio del 2005 y actualmente forma parte del Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas.

El LUP tiene como objetivos fundamentales prestar servicios de alta calidad a la comunidad científica y al sector productivo nacional, formar recursos humanos con una alta capacitación técnico-científica en el área e impulsar el estudio de la Biología de Sistemas basado en la espectrometría de masas macromoleculares. Las aplicaciones de la Proteómica son múltiples tal como: diagnóstico de enfermedades; desarrollo de fármacos; determinación de mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de enfermedades, etc.

Instrumentación

Orbitrap fusion, Orbitrap Velos y UHPLC



La familia **Orbitrap** maneja datos con exactitud de masa y de alta resolución (HRAM), generando mediciones increíbles de hasta 500,000 FWHM (con la opción de alcanzar hasta 1,000,000 de FWHM) a m/z 200. **UHPLC**, con uso de columna capilar y acoplado al MS, hace el mejor dúo en sistema automatizado LC-MS/MS.

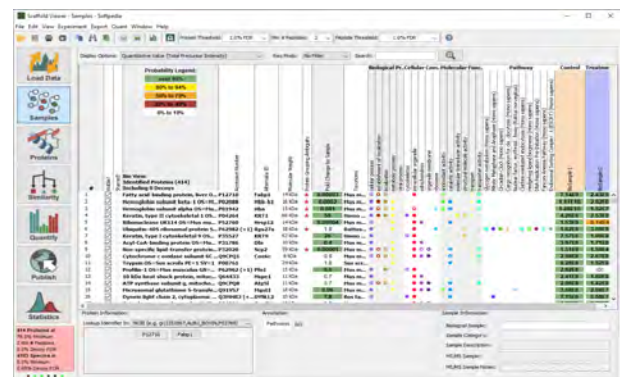
Nuestros servicios

- identificación de proteínas puras o complejas
- Secuenciación de novo
- Identificación de modificaciones post-traduccionales
- Determinación de peso molecular
- Cuantificación mediante labelfree
- Papeo de puentes disulfuro
- Mass Fingerprinting
- purificación de proteínas mediante HPLC
- Medición de proteínas mediante BCA o nanodrop

Flujo de trabajo del L.U.P.



Resultados: Son entregados mediante un software visualizador proteómico (Scaffold 5).



Contáctenos

Teléfono: Oficina: 7773291679 red UNAM 27679

Página: <http://lnatcg.unam.mx/lup/index.html>

E-mail: unidad.proteomica@ibt.unam.mx

“Clonación de una calmodulina alergénica del polen de *Amaranthus palmeri*”

Neftaly R. Arroyo-Encarnación, Darinka P. Durán-Gutiérrez, Marisol López-Hidalgo, Mónica L. Gómez-Esquivel, María E. Jaramillo-Flores, *Cesar A. Reyes-López. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, ENMyH, Instituto Politécnico Nacional. Guillermo Massieu Helguera, No. 239, Fracc. "La Escalera", Ticomán, C.P. 07320, Ciudad de México, México. *Corresponding author (careyes@ipn.mx)

Palabras clave: Calmodulina, Alergia, *Amaranthus palmeri*

Introducción. La alergia es una reacción de hipersensibilidad tipo I mediada por IgE, la cual puede ser desencadenada por antígenos presentes en el polen, causando inflamación en las mucosas que contribuyen en afecciones como el asma y la rinitis alérgica.^{1,3} En EE. UU. y México, el polen de *Amaranthus palmeri* ha sido descrito como una fuente importante de alérgenos. Recientemente se identificó una proteína de unión a IgE en el polen de *A. palmeri*, que fue identificada como una calmodulina alergénica.^{2,4}

Considerando la limitada investigación molecular en la identificación de alérgenos del polen *A. palmeri*, este trabajo tiene como objetivo clonar y expresar la calmodulina de polen *A. palmeri*. La disponibilidad de una proteína recombinante facilita un diagnóstico más preciso, terapias dirigidas y el desarrollo de vacunas alérgicas.

Metodología. A partir de mRNA de polen de *A. palmeri* se sintetizó y se amplificó por PCR el cDNA que codifica para una calmodulina empleando oligonucleótidos basados en la secuencia del mRNA2947 de *A. palmeri* de la base de datos CoGe. Dicha secuencia se identificó mediante tblastn utilizando las secuencias de péptidos de la calmodulina alergénica de *A. palmeri*.² El producto de PCR se ligó al vector de clonación pJET1.2/blunt y la secuencia se comparó con las secuencias depositadas en la base de datos CoGe para el genoma de *A. palmeri*, identificando una posible calmodulina. La secuencia del cDNA se sintetizó dentro de un plásmido de expresión pET3a. La calmodulina fue sobreexpresada en *E. coli* cepa C41 y purificada por precipitación fraccionada con sulfato de amonio, seguido de cromatografía de intercambio aniónico. El seguimiento de la calmodulina recombinante se realizó por inmunodetección con un anticuerpo dirigido contra una calmodulina humana.

Resultados. De la RT-PCR se obtuvo un producto de aproximadamente 450 pb el cual fue ligado al vector pJET para su secuenciación. La secuencia de aminoácidos derivada del cDNA secuenciado, reveló una Identidad del 100% con la secuencia derivada del mRNA2947 reportado para *A. palmeri* (Fig 1). En los ensayos de sobreexpresión y purificación se observó

una banda de ~16 kDa, de acuerdo con lo esperado para calmodulina (Fig. 2), la cual fue reconocida por el anticuerpo dirigido contra calmodulina humana.

| | | |
|-----------------------|--|-----|
| Consensus | MADQLSDDOISEFKEAFLFDKDDGCTTEELGTVMRSLQGNFTEALQDMINEVDADG | 60 |
| rnas2947 protein | MADQLSDDOISEFKEAFLFDKDDGCTTEELGTVMRSLQGNFTEALQDMINEVDADG | 60 |
| secuenciacion protein | MADQLSDDOISEFKEAFLFDKDDGCTTEELGTVMRSLQGNFTEALQDMINEVDADG | 60 |
| Consensus | NGTIDFPEFLNIMARRMKTDSSEELKEAFRVFDKQNGFISAALRHVMTNLGKLTDE | 120 |
| rnas2947 protein | NGTIDFPEFLNIMARRMKTDSSEELKEAFRVFDKQNGFISAALRHVMTNLGKLTDE | 120 |
| secuenciacion protein | NGTIDFPEFLNIMARRMKTDSSEELKEAFRVFDKQNGFISAALRHVMTNLGKLTDE | 120 |
| Consensus | EVDEMIREADVDDGQINYEKFKVYMAK | 149 |
| rnas2947 protein | EVDEMIREADVDDGQINYEKFKVYMAK | 149 |
| secuenciacion protein | EVDEMIREADVDDGQINYEKFKVYMAK | 149 |

Fig. 1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos derivadas de las secuencias de cDNA del polen de *A. palmeri* y del mRNA2947.

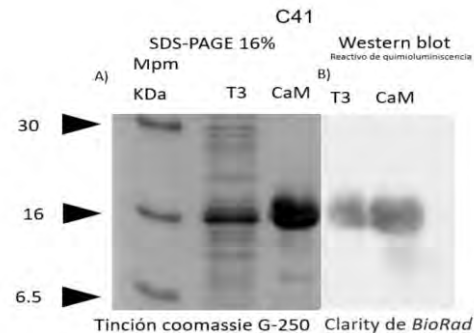


Fig. 2. a) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 16% y b) Western blot de calmodulina recombinante de *A. Palmeri*. Mpm: marcador de peso molecular, T3: extracto proteico bacteriano post-inducción de tres horas, CaM: calmodulina purificada mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico.

Conclusiones. Se obtuvo una calmodulina recombinante de polen de *A. Palmeri*, con una pureza mayor al 95%, la cual puede ser empleada para estudiar su estructura y participación en las reacciones alérgicas.

Agradecimiento. El estudio agradece el generoso apoyo financiero proporcionado por el CONACYT y ENMyH por concedernos permiso para utilizar sus excelentes instalaciones.

Bibliografía.

- 1.-Bousquet, Jean, et al. *Nature Reviews Disease Primers*, 2020, vol. 6, no 1, p. 1-17.
- 2.-Gómez-Esquivel, Mónica, et al. *Molecular Immunology*, 2021, vol. 132, p. 150-156.
- 3.-Pawankar Ruby, et al. Libro blanco sobre alergia de la WAO (2011).
- 4.-Sánchez-del Pino, Ivonne, et al. *Botanical sciences*, 2019, vol. 97, no 3, p. 433-446

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ESTRUCTURAL DE REGIONES INTRÍNSECAMENTE DESORDENADAS Y SU PARTICIPACIÓN EN LA FORMACIÓN DE CONDENSADOS BIOMOLECULARES INDUCIDOS POR ESTRÉS OSMÓTICO

Constanza Enriquez-Toledo, César A. Ponce Diego, Esaú-E. Rodríguez, César Cuevas-Velazquez. Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, 04510, Ciudad de México, CDMX. constoledo705@gmail.com

Palabras clave: Regiones intrínsecamente desordenadas, sensibilidad estructural, condensados biomoleculares

Introducción. La estructura de las regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) es un ensamblaje conformacional altamente dinámico, que carece total o parcialmente de una estructura tridimensional única. Debido a ello, las IDRs están expuestas de manera extensa al solvente circundante. Las variaciones en las propiedades físicas y químicas de dicho solvente inducen transiciones estructurales en las IDRs, llevando a cambios de estados desplegados a estados compactos (1). Esta alteración significativa en la conformación de las IDRs causada por modificaciones en las propiedades fisicoquímicas del entorno se define como sensibilidad estructural (2). El objetivo de este estudio se centra en revelar las características que determinan la sensibilidad estructural de las IDRs frente a cambios en las propiedades fisicoquímicas del ambiente osmótico *in vivo*. Además, busca comprender la relación entre la sensibilidad estructural de las IDRs y su capacidad para relocalizarse en condensados biomoleculares durante condiciones de estrés hiperosmótico.

Metodología. Utilizando la técnica de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), se determinó la sensibilidad estructural de 200 IDRs ante condiciones de estrés hiperosmótico en células vivas de levadura, inducidos por tratamientos con NaCl. Se realizaron análisis de correlación entre las propiedades codificadas en las secuencias IDRs y los niveles de sensibilidad estructural mostrada. Se analizó la localización subcelular a través de microscopía confocal e identificamos la formación de condensados biomoleculares ante los tratamientos de estrés hiperosmótico en las células de levadura.

Resultados.

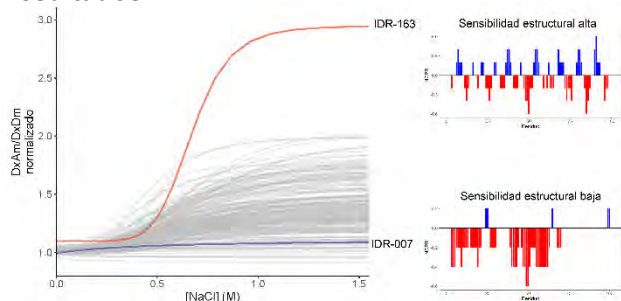


Fig. 1. Sensibilidad estructural de 200 IDRs. Razón de FRET (DxAm/DxDm) normalizada. La IDR-163, resaltada en rojo, exhibe la mayor sensibilidad estructural y también presenta un patrón alternado en los residuos de aminoácidos con carga positiva y negativa. En contraste, la IDR-007, que presenta una baja sensibilidad estructural, carece de este patrón.

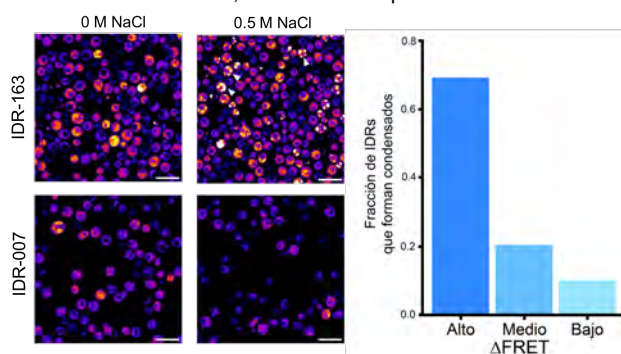


Fig. 2. Las IDRs con alta sensibilidad estructural mostraron la capacidad de relocalizarse en el citoplasma en condiciones de estrés hiperosmótico (0.5 M NaCl).

Conclusiones. Las IDRs que exhiben patrones de aminoácidos con cargas opuestas son altamente sensibles al estrés hiperosmótico *in vivo* y tienen la capacidad de relocalizarse en condensados biomoleculares. Esto sugiere que la sensibilidad estructural facilitada por el patrón de cargas opuestas en las secuencias de IDRs podría influir en la formación de condensados biomoleculares durante el estrés osmótico.

Agradecimiento. Agradecemos el financiamiento de Ciencia de Frontera CONAHCYT clave 252952.

Bibliografía.

1. Cuevas-Velazquez, C. L., Velloso, T., Guadalupe, K., Schmidt, H. B., Yu, F., Moses, D., Brophy, J. A. N., Cosío-Acosta, D., Das, A., Wang, L., Jones, A. M., Covarrubias, A. A., Sukenik, S. & Dinneny, J. R. (2021). *Nature Communications*, 12(1): 1-12
2. Enriquez Toledo, C., & Cuevas Velázquez, C. L. (2023). Caracterización de la sensibilidad estructural al ambiente osmótico de regiones intrínsecamente desordenadas *in vivo*. Tesis de maestría.
3. Jalihal A. P., Pitchiaya S., Xiao L., Bawa P., Jiang X., Bedi K., Parolia A., Cieslik M., Ljungman M., Chinnaiyan A. M., Walter N. G. Multivalent Proteins Rapidly and Reversibly Phase-Separate upon Osmotic Cell Volume Change. *Mol Cell*. 2020 Sep 17;79(6): 978-990.

Caracterización funcional de residuos presentes en la cavidad catalítica de la inulosacarasa de *L. citreum*

Ingrid Mercado del Río¹, Martín González Andrade² y Clarita Olvera Carranza¹, ¹Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos 62210;

²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México 04510.

Palabras clave: Inulosacarasa, inulina, estructura, biocatálisis

Introducción. Las inulosacarasas (ISs) son enzimas glicosil-hidrolasas capaces de producir polisacáridos solubles de fructosa con enlaces $\beta(2-1)$, así como moléculas con capacidad prebiótica, conocidos como inulofructooligosacáridos (InuFOS)¹. Debido al uso creciente de estos polisacáridos en el área alimenticia, médica y farmacéutica², la identificación y estudio de los determinantes estructurales involucrados en la síntesis enzimática de estas moléculas resulta crucial para la generación de polímeros hechos a medida o la generación de nuevas moléculas. En este trabajo, estudiamos la participación en la síntesis de inulina de residuos que forman parte de la cavidad catalítica de la enzima IsIA4, una versión truncada de la inulosacarasa de *L. citreum*.

Metodología.

El modelado de IsIA4 se desarrolló por AlphaFold³, y la identificación *in silico* y posibles interacciones de los residuos pertenecientes a la cavidad catalítica se llevó a cabo mediante acoplamiento y dinámica molecular. La mutagénesis de los residuos se realizó por el método de QuickChange⁴ modificado, y la determinación de los efectos sobre la especificidad de productos y de reacción fue por HPLC-IR y HPAEC-PAD. La caracterización cinética y bioquímica fue por DNS.

Resultados. En la Figura 1, se muestran los residuos de la cavidad catalítica seleccionados para este estudio y las mutantes⁵ S425A, L499F, R618K, F619V, A602P, Y676W, Y692A y R696A, fueron generadas. Las mutantes L499F, Y692A y R696A mostraron una disminución superior al 95% en la actividad enzimática, respecto a la WT. Asimismo, la especificidad hacia la transferencia se vio disminuida, impactando hasta un 94% en la producción de polímero en las mutantes Y692A, R696A, L499F y la doble mutante R618K/F619V (Tabla 1A).

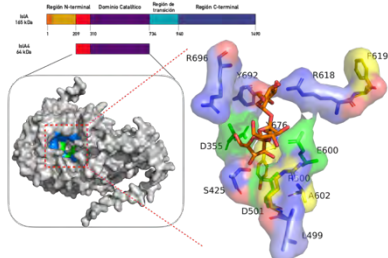


Fig. 1. Modelado de IsIA4 e identificación *in silico* de determinantes estructurales que participan en la catálisis

Por otra parte, las propiedades cinéticas de las mutantes F619V y R618K apuntan hacia un aumento en la eficiencia catalítica 1.4 veces respecto a la WT (Tabla 1B), mientras que en la mutante A602P dicha eficiencia es 3.5 mayor. Se observó que en estas mutantes se favorece la reacción de hidrólisis vs la de transferencia, pudiendo ser esta la razón del aumento en la liberación de azúcares reductores, impactando en el valor de la eficiencia catalítica (Tabla 1A).

Por otro lado, todas las mutantes producen polímero, sin embargo, se observó la generación de productos con un DP de hasta 5 en la mutante A602P.

En cuanto a la estabilidad de las enzimas, se determinó un aumento en el $t_{1/2}$ de 14 y 5 veces en las mutantes A602P y Y676W (Tabla 1B).

Tabla 1. Actividad enzimática, producción de polímero (A) y propiedades cinéticas (B) de mutantes de IsIA4. ND: No determinado. *Datos tomados de Del Moral et al, 2008.

| A | Enzima | Actividad específica global (U/mg) | Relación H/T (%) | Producción de polímero (g/L) | B | | | | |
|---|-------------|------------------------------------|------------------|------------------------------|-------------|---------------------------------|---------|------------------------|-----------------------------|
| | | | | | Enzima | Tiempo de vida media a 35°C (h) | Km (mM) | kc _{at} (1/s) | kc _{at} /Km (mM/s) |
| | IsIA4 (WT) | 84.7 ± 3.7 | 59/41 | 26.3 ± 1.6 | | | | | |
| | A602P | 80.0 ± 6.6 | 64/36 | 15.3 ± 2.9 | | | | | |
| | Y676W | 57.6 ± 1.4 | 56/44 | 26.9 ± 1.3 | | | | | |
| | F619V | 49.2 ± 1.9 | 69/31 | 10.9 ± 1.1 | IsIA4 (WT)* | 2.1 | 142 | 105 | 0.73 |
| | R618K | 40.7 ± 3.6 | ND | ND | A602P | 28.5 ± 2.1 | 59.0 | 148.9 | 2.52 |
| | R618K/F619V | 21.1 ± 1.4 | 86/14 | 1.6 ± 0.6 | Y676W | 11.2 ± 2.7 | 74.2 | 30.1 | 0.41 |
| | R696A | 4.4 ± 0.4 | N.D | N.D | F619V | ND | 84.2 | 85.6 | 1.02 |
| | L499F | 3.7 ± 0.02 | 57/43 | 1.5 ± 1.0 | R618K | ND | 179 | 179 | 1 |
| | Y692A | 1.2 ± 0.2 | N.D | N.D | | | | | |

Conclusiones. Con base en los resultados aquí mostrados se sugiere que los residuos Y692, R696 y R618 participan en el reconocimiento directo del aceptor formando parte de los subsitios +1/+2, y dando forma a la cavidad catalítica. Los residuos A602P, Y676, F619 y L499 son residuos estructurales o de apoyo que, si bien no están en contacto directo con la molécula aceptor, afectan la síntesis de polímero (A602), el reconocimiento de la molécula donadora (L499) o aceptor (F619), o la actividad enzimática y eficiencia catalítica (Y676).

Agradecimiento. Este proyecto fue financiado por el PAPIIT-UNAM a través del proyecto IN227723, por el CONAHCyT, a través de la beca 855138, así como por el PAEP-UNAM.

Bibliografía.

- O. O. Popoola-Akinola, T. J. Raji, B. Olawoye, *Heliyon* **2022**, *8*.
- D. Ni, et al, *Biotechnology Advances* **2019**, *37*, 306.
- M. Mirdita, et al, *Nature Methods* **2022**, *19*, 679
- Y. Xia, et al, *Nucleic Acids Research* **2014**, *43*, DOI 10.1093/nar/gku1189.
- M. E. Rodríguez-Alegría, et al, *Biocatalysis and Biotransformation* **2009**, *28*, 51.

CARACTERIZACIÓN *IN SILICO* DE LAS INTERACCIONES DE FUNGICIDAS CON LA β -TUBULINA DE *BOTRYTIS CINEREA*

Efrén Mar Antonio, M. Andrés Velasco-Saavedra y Rodrigo Aguayo-Ortiz
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad de México, 04510, México; E-mail: rodaguayo@comunidad.unam.mx

Palabras clave: β -tubulina, *Botrytis cinerea*, Fungicidas

Introducción.

Botrytis cinerea es un hongo patógeno que afecta distintas especies vegetales de consumo humano, siendo el responsable de pérdidas económicas significativas en la industria agrícola.¹ Los fungicidas carbendazim (CBZ), dietofencarb (DEF) y zoxamida (ZOX) son utilizados para el control de este patógeno, los cuales actúan inhibiendo el ensamblaje de los microtúbulos al unirse a la subunidad β -tubulina.² Debido a la creciente aparición de cepas resistentes al tratamiento con estos fungicidas, es necesario la búsqueda de nuevas alternativas para su control. Por lo anterior, en el presente trabajo se emplearon diferentes aproximaciones de acoplamiento y dinámica molecular para identificar el posible sitio y modo de unión de estos compuestos en la β -tubulina. Adicionalmente, se evaluó el efecto de mutaciones en la afinidad de los ligandos por medio de métodos de transmutación atómica.

Metodología.

Se construyó el modelo tridimensional del heterodímero de α/β -tubulina de *B. cinerea* mediante modelado por homología. Se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular covalentes para ZOX (R y S) en el modelo silvestre (BcABT_{WT}) y acoplamiento no covalente para CBZ y DEF en los modelos BcABT_{WT} y BcABT_{E198A}, respectivamente. En cuanto a los estudios de dinámica molecular, se realizaron tres réplicas de 200 ns de los sistemas antes mencionados con el programa GROMACS³. Empleando el programa PMX⁴, se llevaron a cabo las transmutaciones atómicas para el cálculo de la doble diferencia de la energía libre de unión ($\Delta\Delta G$) como resultado de la mutación

Resultados.

Nuestros estudios de acoplamiento molecular permitieron identificar el modo de unión de los tres ligandos en la β -tubulina. Se observa la formación de puente de hidrógeno de la ZOX con la V236. En el caso de CBZ, forma este tipo de interacciones con E198 y V236. Por su parte, el DEF únicamente forma dicha interacción con la cadena principal de V236. Este último se orienta en dirección a la cavidad hidrofóbica generada por la mutación E198A.

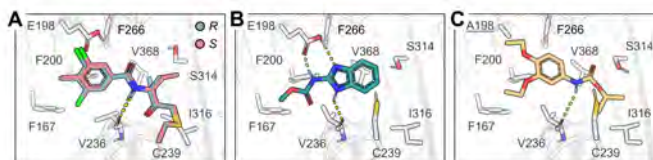


Figura 1. Acoplamiento molecular en la β -tubulina de (A) ZOX (R/S) y (B) CBZ en BcABT_{WT} y (C) DEF en BcABT_{E198A}

La transmutación atómica sugiere que la mutación E198V aumenta la afinidad de ZOX en el sitio de unión, mientras que la mutación E198K la disminuye. En el caso de CBZ, las diferentes mutaciones en la posición 198 disminuyen la afinidad de este compuesto por el sitio, mientras que para DEF se confirma su preferencia por la presencia de la alanina en la posición 198.

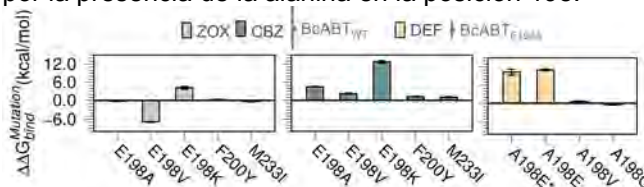


Figura 3. Resultados de ($\Delta\Delta G$) de las mutaciones que conducen a resistencia en la β -tubulina hacia CBZ, ZOX y DEF.

Conclusiones.

El enantiómero R de la ZOX presentan un mejor perfil de interacción que el enantiómero S. El residuo E198 es esencial para la interacción del CBZ con la β -tubulina en su forma silvestre, mientras que ZOX y DEF no dependen de este residuo para su unión. Los resultados de transmutación atómica coinciden con la información experimental reportada.

Agradecimiento.

Se le agradece a (DGTIC) por el apoyo recibido en el uso de la supercomputadora "Miztli", y al CONACyT por la beca otorgada. Este estudio fue financiado por DGAPA (PAPIIT IA201022).

Bibliografía

- (1) Adnan, M.; Hamada, M. S.; Hahn, M.; Li, G.-Q.; Luo, C.-X. *Phytopathology Research* **2019**, 1 (1).
- (2) Young, D. H. Springer Japan, 2015; pp 93–103.
- (3) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. *SoftwareX* **2015**,
- (4) Gapsys, V.; De Groot, B. L. *J Chem Inf Model* **2017**, 57 (2), 109–114.

IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA PROTEÍNA INH A DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Sebastián Garay^{1,2}, Luis Córdova Bahena², Mayra Silva Miranda¹ y Clara Inés Espitia Pinzón¹.

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México, 04510 ²Laboratorio de Farmacología Molecular, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México, 04510. sebastiansg@iibiomedicas.unam.mx

Palabras clave: InhA, Tuberculosis, Cribado Virtual

Introducción. La Enoyl-ACP reductasa (InhA) es una diana terapéutica de interés en el tratamiento de la tuberculosis debido a su papel clave en la supervivencia de su agente causal *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).

El objetivo de este trabajo es identificar moléculas con potencial actividad inhibitoria de la enzima InhA de Mtb.

Metodología. Se llevó a cabo un proceso de cribado virtual (CV) (1) empleando como filtros subsecuentes un modelo de farmacóforo (MF) (2), acoplamiento molecular (AM) *in silico*, simulaciones de dinámica molecular (SDM) y cálculo de energía de unión usando el método MM/PBSA (3).

Resultados. A partir del análisis de las SDM de 12 inhibidores de referencia (IR) (Tabla 1) se generó un modelo de farmacóforo que consta de 5 elementos: 3 aceptores de enlaces de hidrógeno, 1 donador de enlaces de hidrógeno, y un anillo aromático (Figura 1).

Tabla 1. Frecuencia de interacciones totales entre residuos de InhA y los IR expresada en porcentaje. Fondo amarillo representa enlaces de hidrógeno y verde interacciones Pi.

| Nombre: | Met98 | Gln100 | Lys165 | Phe149 | Tyr158 |
|---------|-------|--------|--------|--------|--------|
| ZID | | 105 | 38 | | 1 |
| 1. TCL | | | | 17 | |
| 2. VMY | 153 | 18 | | | 12 |
| 3. XTW | | 12 | | | 26 |
| 4. 3KY | | 13 | | | |
| 5. 9NU | 66 | 19 | | 32 | 14 |
| 6. 6KA | 169 | 24 | | | |
| 7. IUS | | | 54 | 14 | 27 |
| 8. KVI | 82 | 22 | | | |
| 9. JUS | 70 | | | | |
| 10. 2TK | | | 116 | | 19 |
| 11. TCU | | | | | |
| 12. 7I3 | 97 | | | | 14 |

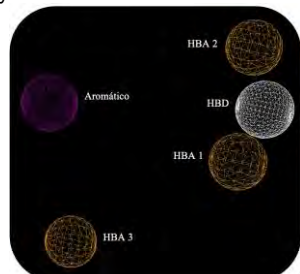


Figura 1. Modelo de farmacóforo para inhibidores de InhA generado mediante SDM.

Se identificaron y acoplaron en InhA 16 compuestos con las características del MF entre los que se incluyen 4 fármacos: Cerivastatina, Ritonavir, Etopósido y Cefoxitina. En la Tabla 2 se muestran los valores calculados de RMSD con respecto al MF, así como de los valores de RMSD de las SDM de las moléculas de interés identificadas (MI) y sus valores de energía de unión.

Tabla 2. Resultados del CV de las diferentes moléculas identificadas. Se incluye uno de los inhibidores de referencia (TCL). EL número entre paréntesis corresponde al identificador CID de PubChem.

| Molécula | MF | AM | SDM | | MM/PBSA |
|-------------------|----------|--------|-------------------|------------------|-------------------------|
| | RMSD (Å) | Score | RMSD (Å) proteína | RMSD (Å) Ligando | Energía de unión KJ/mol |
| TCL | - | - | 3.34 ± 0.61 | 0.98 ± 0.59 | -92.3 ± 13.09 |
| Cerivastatina | 3.9 | -7.543 | 2.4 ± 0.58 | 1.83 ± 0.48 | -30.32 ± 25.85 |
| Ritonavir | 3.9 | -9.891 | 1.99 ± 0.35 | 3.94 ± 0.39 | -162.68 ± 21.96 |
| Etopósido | 3.2 | -9.45 | 2.29 ± 0.44 | 1.28 ± 0.30 | -69.20 ± 23.87 |
| Cefoxitina | 3.3 | -7.731 | 3.61 ± 0.55 | 1.78 ± 0.27 | 23.92 ± 57.39 |
| MI 1 (135403657) | 3.6 | -8.348 | 2.63 ± 0.27 | 2.51 ± 0.54 | 344.58 ± 75.22 |
| MI 2 (157018771) | 2.1 | -8.16 | 2.44 ± 0.51 | 2.5 ± 0.42 | -88.04 ± 17.63 |
| MI 4 (643975) | 2.9 | -10.09 | 1.92 ± 0.41 | 3.06 ± 0.58 | 111.27 ± 43.75 |
| MI 5 (129553780) | 3.9 | -7.493 | 2.54 ± 0.42 | 1.2 ± 0.28 | -93.63 ± 10.25 |
| MI 7 (1072) | 3.7 | -7.414 | 2.26 ± 0.50 | 1.41 ± 0.69 | -60.62 ± 20.17 |
| MI 8 (65638212) | 3.6 | -7.317 | 2.3 ± 0.32 | 1.44 ± 0.20 | 173.01 ± 43.24 |
| MI 9 (40469422) | 2.4 | -7.403 | 2.27 ± 0.34 | 1.12 ± 0.40 | -48.84 ± 13.54 |
| MI 10 (135875237) | 3.4 | -8.83 | 2.68 ± 0.79 | 2.91 ± 0.32 | -83.99 ± 14.28 |
| MI 11 (72159521) | 3 | -7.455 | 2.35 ± 0.38 | 1.55 ± 0.37 | -99.90 ± 16.17 |
| MI 12 (40210685) | 3.1 | -8.17 | 2.44 ± 0.51 | 2.3 ± 0.37 | -60.60 ± 16.13 |
| MI 13 (53054058) | 3.4 | -7.405 | 2.56 ± 0.88 | 1.56 ± 0.26 | -65.53 ± 16.67 |
| MI 18 (46366243) | 3.6 | -7.108 | 2.8 ± 0.61 | 1.51 ± 0.52 | -113.57 ± 13.44 |

Se obtuvo un promedio de la energía de unión de los IR (-107.55 KJ/mol) para seleccionar las moléculas que equipararan o mejoraran ese promedio. En la figura 2 se muestra uno de los complejos obtenidos.

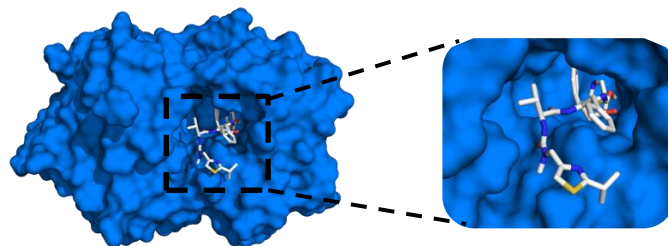


Figura 2. Complejo InhA/Ritonavir

Conclusiones. Las moléculas Ritonavir y MI18 mostraron ser los mejores candidatos para ser evaluados mediante ensayos biológicos *in vitro* al tener una energía de unión mejor que el promedio de los IR.

Agradecimiento. A la beca CONAHCYT 1224848 y a las horas de cómputo provistas por LANCAD-UNAM-DGTIC-386.

Bibliografía.

- Walters, W. P., Stahl, M. T., & Murcko, M. A. (1998). *Drug discovery today*, 3(4), 160-178.
- Yang, S. Y. (2010). *Drug discovery today*, 15(11-12), 444-450.
- Kumari, R., Kumar, R., Open Source Drug Discovery Consortium, & Lynn, A. (2014). *J. Chem. Inf. Model.*, 54(7), 1951-1962.

"Estudio de la proteína cerato-platanin FkCER1 del hongo *Fusarium kuroshium* e identificación de sus proteínas interactoras"

Nidia Sánchez-León¹, Eric-Edmundo Hernandez-Dominguez¹²

¹Instituto de Ecología A. C. , Xalapa, Veracruz, México. ²Investigador por México-CONAHCYT eric.hernandez@inecol.mx

Carretera antigua a Coatepec 351 Col. El Haya, Xalapa, Veracruz. CP 91073 Tel: (228) 8421800 Ext. 3616

Palabras clave: Cerato-platanin, hongos ambrosiales.

Introducción.

Los hongos fitopatógenos utilizan los elicitores, que generalmente son proteínas ricas en cisteínas como parte de la maquinaria biológica para establecer la enfermedad. Que se produzca una infección depende en gran parte de las interacciones que los elicitores puedan generar con otras proteínas tanto del hongo como de la planta afectada (1). El hongo ambrosial *Fusarium kuroshium*, causa la muerte regresiva en árboles, lo que puede generar grandes afectaciones a nivel forestal y agrícola. Recientemente, a partir de datos transcriptómicos se identificaron dos proteínas cerato-platanin FkCER1 y KCER2 (2). Las proteínas cerato-platanin son proteínas ricas en cisteínas exclusivas de hongos que participan en el desarrollo del hongos además de estar involucradas en el establecimiento de la infección.

Objetivo.

Identificar las interacciones proteína-proteína de la proteína Cerato-platanin FkCER1 de *Fusarium kuroshium*.

Metodología.

Se utilizaron los programas Alpha-fold y ESMFold para obtener los modelos tridimensionales de FkCER1. Para producir la proteína recombinante, la secuencia codificante de FkCER1 fue clonada en el plásmido pGem-T-easy y posteriormente se subclonó en el vector pET28. La inducción se realizó con 1mM de IPTG, empleando células de la cepa de *E. coli* Shuffle T7. La proteína fue purificada por cromatografías IMAC y de exclusión molecular. Se confirmó su identidad por medio de SDS-PAGE, Western Blot y ESI-MS/MS.

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INTERACTORAS.

Para identificar las proteínas de *C. sinensis* que interactúan con FkCER1 se realizaron ensayos de afinidad por columnas IMAC. Los complejos proteicos fueron separados por electroforesis 2D y la identificación de las proteínas interactoras se hará por medio de ESI-MS-MS.

Resultados.

Se obtuvo la predicción de la estructura tridimensional de FkCER1, con un pLDDT >85 (Fig. 1A) y se comparó con las estructuras obtenidas por MNR y cristalografía.

Se establecieron las condiciones para producir y purificar FkCER1 (Fig 1B y C).

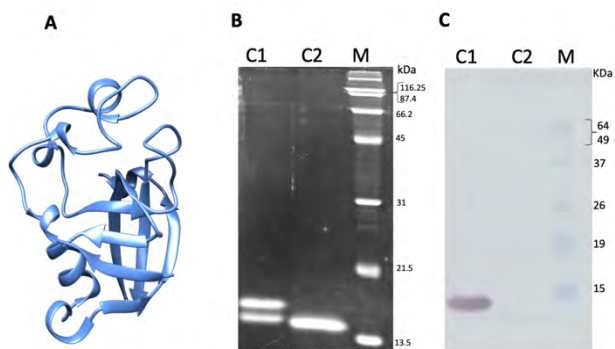


Fig. 1. A) Estructura tridimensional predicha para FkCER1. B) Electroforesis SDS-PAGE de FK CER1 purificada C) Western blot de FK CER1 utilizando un anticuerpo que reconoce la etiqueta de histidinas. C1. FK CER1 etiquetada C2. FK CER1 sin etiqueta. M. Marcador molecular.

De los ensayos de interacción FkCER1 vs *Citrus sinensis* se observaron varias manchas de proteínas que podrían interactuar con FkCER1 y las cuales serán identificadas por ESI-MS/MS. Se realizaron ensayos de DSF para conocer la estabilidad de FkCER1.

Conclusiones.

- La estructura tridimensional de la proteína FkCER1 presenta las características propias de las proteínas pertenecientes a la familia de las cerato-platanin.
- El sistema de expresión heteróloga utilizado, permitió obtener la proteína FkCER1 purificada.
- FkCER1 parece establecer interacciones con proteínas de *C. sinensis*.

Agradecimiento.

NSL recibe beca postdoctoral del CONAHCyT.

Bibliografía.

1. Stergiopoulos I & Wit PJGM. (2009). *Annu. Rev. Phytopathology*.47:233-63.
2. Sánchez-Rangel D, Hernández-Domínguez E.E, Pérez-Torres C.A, Ortíz-Castro R, Villafán E, Rodríguez-Hass B, Alonso-Sánchez A, López-Buenfil A, Carrillo-Ortiz N, Hernández-Ramos L & Ibarra-Laclette E. (2018). *BMC Genomics*.19:721

PLANT ORGANELLAR MSH1 IS A DISPLACEMENT LOOP SPECIFIC ENDONUCLEASE

Peñafiel-Ayala Alejandro, Peralta-Castro Antolín, Mora-Graduño Josué, Zambrano-Perea Angie, García-Medel Paola, Díaz-Quezada Corina, Luis G. Briebe

Unidad de Genómica Avanzada, Cinvestav-Irapuato. Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León C.P. 36824 Irapuato, Gto., México

alejandro.penafiel@cinvestav.mx

Key words: D-loops, plant organellar genomes, recombination

Introduction

Plant organellar genomes exhibit low mutation rate¹. This phenomenon is remarkable given the exposure of these genomes to damaging agents, moderate fidelity of polymerases and a lack of mismatch repair pathway in chloroplast and mitochondria^{2,3}. A single gene named MutS Homologue 1 (*MSH1*) is necessary for maintaining low mutation rates and preventing genomic rearrangements^{3,4}. *MSH1* gene is phylogenetic linked to the MutS family and acquired a C-terminal GIY-YIG endonuclease domain, only present in green plant (Viridiplantae)⁵. *MSH1* has been related to a possible mismatch repair pathway (MMR) in plant organelles, due to the structural resemblance to a bacterial MutS1, but till date there is no biochemical data for a supporting mechanism. Here we elucidate the biochemical activity of *MSH1*.

Methods

MSH1 gene lacking the targeting sequence (first 32 aminoacids) was codon optimized and clone in a expression vector (pBAD-SUMO). BL21 cells were transformed and grown in TB media, expressed using 0.1% L-arabinose. For EMSA and endonuclease assays, synthetic DNA structures fluorescently labelled were incubated with increasing amount of protein or stopped at different times. Denaturing UREA-PAGE gels or Native TBE gels were run and visualized in a Typhoon (Cytiva).

Bibliography

- 1) Palmer J., Adams K., Cho Y., Song K. (2000). PNAS. 97(13)
- 2) Briebe L.G. (2019). Plants. 8.
- 3) Wu Z., Waneka G., Broz A., King C.R., Sloan D.B. (2020). PNAS. 117
- 4) Shedje V., Arrieta-Montiel M., Christensen A.C., Mackenzie S. (2007). Plant Cell. 19.
- 5) Bai M.Z., Guo Y.Y. (2023). IJMS. 24.

Results

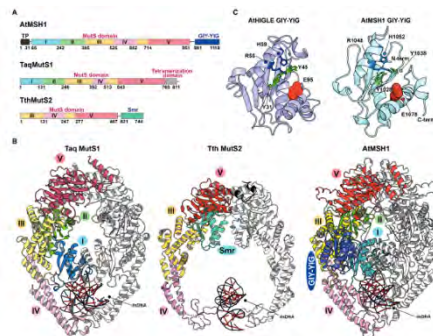


Fig. 1. Plant *MSH1* is a member of the MutS family and carries an additional C-terminal endonuclease domain.

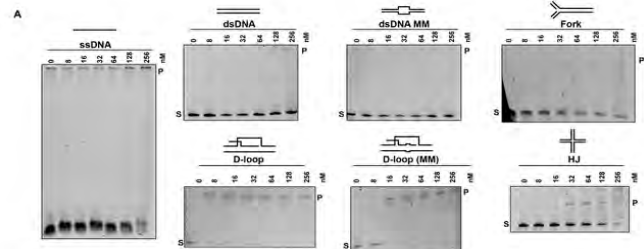


Fig. 2. *MSH1* binds selectively to recombination intermediates.

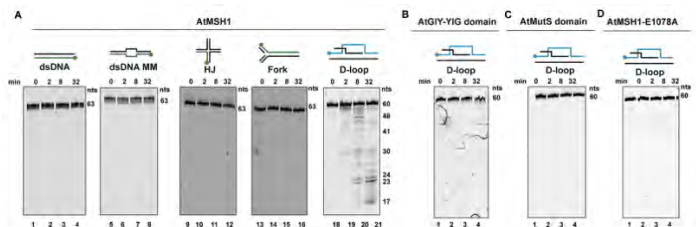


Fig. 3. The DNA cleavage activity of *MSH1* is restricted to D-loops.

Conclusions

MSH1 selectively cleaves D-loops, supporting the role of this enzyme in preventing recombination in between short repeats.

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE C-FICOCIANINA/AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE-ZEÍNA

Moises Job Galindo-Pérez¹, Lizbeth Martínez-Acevedo², José Campos-Terán¹, Dolores Reyes-Duarte¹, Ingrid Hernández-Martínez¹, Marcia Morales-Ibarra¹, Izlia Jazheel Arroyo-Maya*¹.

¹ Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Ciudad de México, C.P. 05348. ² Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de México, C.P. 04960. moises.galindo@zaragoza.unam.mx

Palabras clave: ficobiliproteínas, autoensamblaje, nanotecnología

Introducción. Las proteínas derivadas de cianobacterias, como la C-ficocianina (C-F), han ganado interés en el área de alimentos debido a sus propiedades funcionales. Una de las características de la C-F es su color azul brillante que la hace útil como colorante natural para alimentos⁽¹⁾. Sin embargo, la C-F puede degradarse por diversos factores fisicoquímicos, lo que limita sus aplicaciones⁽²⁾. Una alternativa para su estabilización es la nanoencapsulación. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas de preparación de nanopartículas (NPs) de C-F a partir de aislado de proteína de suero de leche (WPI) y la proteína zeína (C-F/WPI-zeína), utilizando el método de interacción electrostática por cambio de pH⁽³⁾.

Metodología.

Se realizó un diseño factorial 2³: las variables independientes fueron la concentración de zeína (0.01 a 0.1 mg), de WPI (0.01 a 0.1 mg) y de C-F (0.5 a 1.5 mg/mL), como se muestra en la **Tabla 1**. Las variables de respuesta fueron el tamaño de partícula (TP), el índice de polidispersidad (IPD), el potencial zeta (ζ), la eficiencia de encapsulación (EE) y la eficiencia de proceso (EP). El TP, IPD y ζ fueron determinados por dispersión dinámica de luz. La EE se determinó por espectrofotometría y la EP por filtración.

Tabla 1. Diseño factorial 2³ para la obtención de NPs de C-F/WPI-zeína

| Lote | Zeína (g) | WPI (g) | C-F (mg/mL) |
|------|-----------|---------|-------------|
| L1 | 0.01 | 0.1 | 0.5 |
| L2 | 0.01 | 0.01 | 1.5 |
| L3 | 0.055 | 0.1 | 1.5 |
| L4 | 0.055 | 0.01 | 0.5 |
| L5 | 0.01 | 0.055 | 0.5 |
| L6 | 0.1 | 0.1 | 0.5 |
| L7 | 0.01 | 0.1 | 1.5 |
| L8 | 0.1 | 0.1 | 1 |
| L9 | 0.1 | 0.01 | 1.5 |
| L10 | 0.01 | 0.01 | 1 |
| L11 | 0.1 | 0.01 | 0.5 |
| L12 | 0.055 | 0.055 | 1 |
| L13 | 0.1 | 0.055 | 1.5 |

Resultados. La caracterización de las NPs fabricadas por autoensamblado por cambio de pH a las diferentes condiciones se presenta en la **Tabla 2**. De acuerdo con el análisis de deseabilidad (D=0.757), las condiciones óptimas para la obtención de NPs fueron 0.010 g de zeína, 0.0536 g de WPI y 0.5 mg/mL de C-F, obteniéndose nanopartículas con TP de 203.34 ± 8.37 nm, IPD de 0.253 ± 0.01, ζ de -16.20 ± 1.63 mV, EE del 68 ± 7.54% y EP del 96.7 ± 1.2%.

Tabla 2. Caracterización de las NPs de C-F/WPI-zeína

| Lote | TP (nm) | IPD | ζ (mV) | EE (%) | EP (%) |
|------|---------|------|--------------|--------|--------|
| L1 | 137.60 | 0.16 | -14.73 | 55.36 | 91.15 |
| L2 | 277.50 | 0.66 | -16.73 | 88.54 | 75.12 |
| L3 | 104.09 | 0.44 | -8.58 | 62.61 | 39.33 |
| L4 | 453.07 | 0.51 | -20.80 | 85.64 | 27.98 |
| L5 | 222.23 | 0.19 | -16.60 | 69.67 | 84.42 |
| L6 | 182.70 | 0.82 | -14.30 | 52.68 | 48.18 |
| L7 | 238.63 | 0.52 | -11.73 | 72.28 | 39.87 |
| L8 | 334.90 | 0.49 | -10.24 | 66.67 | 54.16 |
| L9 | 4751.33 | 0.93 | -12.97 | 42.43 | 13.64 |
| L10 | 178.03 | 0.70 | -14.00 | 83.26 | 37.85 |
| L11 | 560.63 | 0.58 | -7.40 | 83.15 | 18.54 |
| L12 | 353.67 | 0.50 | -10.46 | 64.96 | 31.95 |
| L13 | 210.40 | 0.66 | -10.18 | 74.48 | 52.00 |

Conclusiones. Con el diseño factorial y el método de autoensamblado por cambio de pH, se lograron establecer las condiciones de preparación de nanopartículas de C-F/WPI-zeína para futuras aplicaciones en áreas de salud y alimentos.

Agradecimiento. Galindo-Pérez y Martínez-Acevedo agradecen al CONAHCyT por las becas posdoctorales.

Bibliografía.

- Kuddus M., Singh P., Thomas G., Ali A. (2015). Production of C-phycoerythrin and its potential applications. En: *Biotechnology of Bioactive Compounds*. Gupta V., Tuohy M., O'Donovan A., Lohani M. John Wiley & Sons. 283–299. p. 283–99.
- Adjali A., Clarot I., Chen Z., Marchioni E., Boudier A. (2022) *J Pharm Anal.* 2022;12(3):406–14
- Wei Y., Zhan X., Dai L., Zhang L., Mao L., Yuan F., et al. (2021) *LWT-FOOD SCI TECHNOL.* 139(2021): 110605.

DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE INHIBIDORES DE LA MAPK p38 α CON POTENCIAL
ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

M. Andrés Velasco-Saavedra y Rodrigo Aguayo-Ortiz

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad de México, 04510, México. E-mail: rodaguayo@quimica.unam.mx

Palabras clave: Diseño de fármacos, MAPK p38 α , imatinib.

Introducción. Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) p38 son una familia de serin/treonin cinasas que juegan un papel esencial en la transducción de estímulos ambientales y respuesta a estrés. Una actividad aberrante de esta familia puede impulsar una gran variedad de trastornos a varios niveles, como el desarrollo de cáncer, pues están involucradas en la supervivencia, migración y resistencia de las células tumorales. Dentro de este grupo, la MAPK p38 α (MAPK14) es la que se expresa de forma ubicua y a mayores niveles en el organismo, por lo que se ha identificado como un objetivo terapéutico prometedor. Hasta la fecha, no se ha aprobado en el mercado ningún inhibidor de la MAPK14 a pesar del rol que tiene en diferentes enfermedades, debido a la toxicidad o pérdida de potencia (1).

En este trabajo, se busca emplear herramientas computacionales para el diseño y optimización de inhibidores de la MAPK p38 α , partiendo de la estructura del imatinib, con un enfoque cinético y termodinámico.

Metodología. A partir de la información cristalográfica disponible de MAPK14 (360 cristales), se hicieron propuestas de modificaciones a la estructura del imatinib, que posteriormente fueron evaluadas con la metodología de transmutación atómica por PMX (2). Adicionalmente, se realizó la predicción del tiempo de residencia (T_R) con la metodología *tau-Random Acceleration Molecular Dynamics* (τ RAMD) (3).

Resultados. A partir de los resultados obtenidos con la transmutación atómica (Fig. 1), se demostró que los sustituyentes en la posición *meta* del fenilo (del core del imatinib) presentan mejores resultados comparados con aquellos en *orto* y *para*. Por esta razón, se continuó evaluando diferentes sustituyentes en esta posición. Adicionalmente, se realizó la determinación de los T_R a diferentes compuestos que han sido reportados anteriormente en la MAPK14 (4), para validar que la metodología funciona con el sistema de interés. Se encontró que los valores calculados tienen una tendencia similar a los experimentales (Fig. 2).

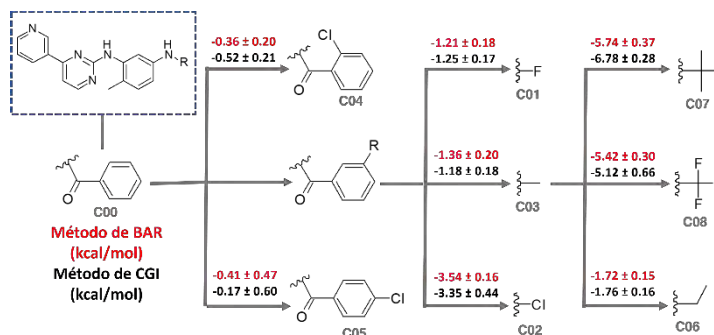


Fig. 1. Primer acercamiento del crecimiento con transmutación atómica empleando la metodología de PMX.

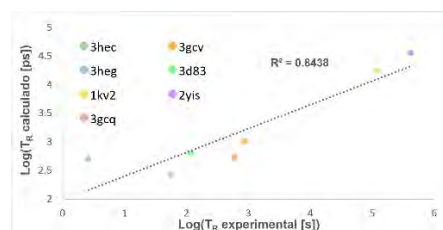


Fig. 2. Validación de la metodología de τ RAMD empleando los datos experimentales reportados por Liu, et al. (4).

Conclusiones. Los sustituyentes en posición *meta* del fenilo con características hidrofóbicas son los que muestran un mayor aumento en la afinidad del sistema. A los compuestos con mejores resultados se les hará la predicción del tiempo de residencia (T_R), serán sintetizados y se realizará la evaluación biológica.

Agradecimiento. Se agradece a la DGTIC por el apoyo recibido en el uso de la supercomputadora HP Cluster Platform 3000SL "Miztli". M.A.V.S agradece a CONAHCyT por la beca otorgada (CVU: 1271168).

Bibliografía.

- Martínez A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. (2020). *Int J Mol Sci.* 21(6):1913.
- Gapsys V, Michielssens S, Seeliger D, De Groot BL. (2015) *J Comput Chem.* 36(5):348-354
- Kokh DB, Amaral M, Bomke J. (2018). *J Chem Theory Comput.* 14(7):3859-3869.
- Liu H, Su M, Lin HX, Wang R, Li Y. (2022). *ACS Omega.* 7(22):18985-18996.

DETERMINACIÓN DEL ESPACIO DE SECUENCIA DE LA TRIOSA FOSFATO ISOMERASA DE *E. COLI*

Fabiola Cortés-Pedroza, Lorenzo Segovia. Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca CP62100, fabiola.c.p1@gmail.com

Palabras clave: landscape, barril TIM, mutagénesis.

Introducción. Dentro de la gran variedad de plegamientos de enzimas, los barriles TIM son los más abundantes y diversos; son capaces de llevar a cabo cinco de los siete tipos de reacciones de la clasificación EC [1]. Sin embargo, durante su evolución, es probable que la naturaleza aún no haya explorado todas las variaciones posibles, por lo que poseen un gran potencial para adquirir nuevas funciones además de las ya descritas actualmente; por ello, explorar la tolerancia al plegamiento de barriles TIM como la TIM de *E. coli* puede ayudarnos a identificar zonas susceptibles a ser modificadas para rediseñar esta enzima con nuevas funciones.

El objetivo de este trabajo es determinar el espacio de secuencia de la TIM de *E. coli* utilizando enfoques experimentales y bioinformáticos para identificar los residuos tolerantes a mutaciones que permiten conservar la actividad catalítica y/o el plegamiento.

Metodología. 1. Se alinearon las secuencias de referencia de NCBI de las TIM homologas a la de *E. coli* y se calcularon las fracciones de aminoácidos por residuo (p_i) y el número efectivo de sustituciones (k^*), cuyos valores bajos indican secuencia estricta y valores altos una alta variabilidad [2].

$$S = -\sum_{i=1}^k p_i \log_2 p_i \quad k^* = 2^S$$

2. Se generaron *in silico* secuencias de homólogos estructurales de la TIM de *E. coli* utilizando la IA ProteinMPNN [3], con las cuales se calculó k^* por residuo y se comparó con la variación natural.

3. Se construyó el plásmido pT4tpiACAT con un casete de resistencia a kanamicina y una fusión traduccional de tpiA con cat como reportero de plegamiento. Se realizó un banco de 23000 mutantes sencillas y dobles con mutagénesis aleatoria. Dicho banco fue construido con selección en kanamicina y en bacterias BL21 Δ tpiA. El banco se colectó en pool y se volvió a seleccionar en LB Cn para obtener las variantes correctamente plegadas (94.25%) y en M9 Km para las variantes que conservan catálisis (86.25%); se extrajo plásmido de cada banco y se enviaron a secuenciación con Illumina (resultados pendientes de recibir).

Resultados. Al comparar k^* de las variantes naturales contra la variación generada con ProteinMPNN se pueden encontrar diferencias principalmente en los

residuos involucrados con la actividad catalítica (figura 1) y sus alrededores, como Asn11 y Lys13 en el loop-1, His95 en el loop-4 y Glu167 en el loop-6 [4], puesto que ProteinMPNN únicamente considera la conservación del plegamiento, mientras que las secuencias de la naturaleza tienen secuencia estricta en dichos residuos y los que están a sus costados.

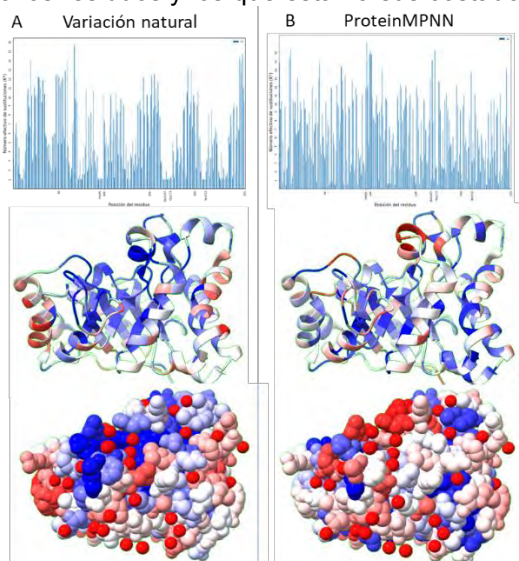


Fig. 1. Número efectivo de sustituciones (k^*) de las variantes naturales (A) y lo predicho por ProteinMPNN (B). En azul los residuos con secuencia estricta y en rojo con alta variabilidad.

Conclusiones. Se han identificado residuos de secuencia estricta para plegamiento y catálisis y aquellos únicamente de plegamiento, los cual está pendiente comparar con lo experimental.

Agradecimiento. A CONAHCYT por la beca de maestría y PAPIIT proyecto CV200322 otorgado a LSF.

Bibliografía.

1. Nagano, N., Orengo, C. A., & Thornton, J. M. (2002). *Journal of Molecular Biology*, 321(5), 741–765.
2. Deng, Z., Huang, W., Bakkalbasi, E., Brown, N. G., Adamski, C. J., Rice, K., Muzny, D., Gibbs, R. A., & Palzkill, T. (2012). *Journal of Molecular Biology*, 424(3–4), 150.
3. Dauparas, J.; Anishchenko, I.; Bennett, N.; Bai, H.; Ragotte, R.J.; Milles, L.F.; Wicky, B.I.M.; Courbet, A.; de Haas, R.J.; Bethel, N.; et al. *Science* 2022, 378, 49–56.
4. Olivares-Illana, V., Riveros-Rosas, H., Cabrera, N., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R., Costas, M., & Gómez-Puyou, A. (2017). *Proteins*, 85(7), 1190–1211.

INGENIERÍA DE PROTEÍNA DE UNA CUTINASA DE *Aspergillus nidulans* PARA INCREMENTAR LA DEGRADACIÓN DE POLI(ETILEN TEREFALATO)

Augusto Castro¹, Adela Rodríguez², Rogelio Rodríguez¹ y Amelia Farrés¹. ¹Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México, 04510. ²Instituto de Química, UNAM, Ciudad de México, 04510
jaugusto_09roca@comunidad.unam.mx

Palabras clave: Cutinasa, Biodegradación, Plásticos

Introducción. Uno de los plásticos más utilizados en la industria es el poli(etileno tereftalato) (PET) constituido por etilenglicol (EG) y ácido tereftálico (TPA). Sin embargo, los productos generados con el PET terminan contaminando los ecosistemas e incluso se ha detectado que se pueden internalizar en las células¹. La biotecnología en los últimos años ha permitido diseñar una variante de una cutinasa que puede hidrolizar PET amorfo hasta un 90 % y producir TPA². Otras hidrolasas de PET deben mejorar su termoestabilidad y su actividad catalítica hacia los diferentes tipos del PET³. *Aspergillus nidulans* expresa la enzima ANCUT1, que ha mostrado que hidroliza PET por disminución de masa y de la cristalinidad con producción de TPA con una baja productividad^{4,5}. El objetivo de este trabajo es mejorar la actividad catalítica de la ANCUT1 para despolimerizar PET, haciendo un estudio *in silico* para analizar la interacción de la enzima con un oligómero de PET y diseñar una variante. La ingeniería de la enzima conduciría al desarrollo de un biocatalizador con una actividad mayor comparando con la enzima silvestre.

Metodología. A partir de un modelo 3D de la ANCUT1 creado con AlphaFold 2.0 (Rodríguez-Sotres, 2021). Se hicieron dinámicas moleculares a 60 °C y en presencia de Mg²⁺ para identificar residuos que interactúan con un oligómero de PET, se escogieron dos residuos que influyen en la interacción. Ramírez en el 2022 diseñó el vector que contiene el gen de la ANCUT1, se hizo la mutagénesis para una doble mutante (DM). Se clonó en *E. coli*, se expresó y purificó por columna de afinidad para histidinas. Hasta el momento las enzimas puras se han aplicado en la reacción de hidrólisis de láminas de PET amorfo (PA) en un intervalo de temperatura de 40 a 65 °C y láminas de PET biaxial (PB) a 60 °C por 72 h. Los productos de degradación se cuantificaron por espectroscopía a 241 nm y los cambios de cristalinidad por DSC.

Resultados. Se identificaron 19 residuos que interaccionan con el ligando y se encuentran en la hendidura que soporta el sitio activo. En ausencia de Mg²⁺ la enzima tiene una conformación cerrada y pasa a una conformación abierta en presencia del ión. La DM se diseñó para mantener la conformación abierta.

Después de la reacción de hidrólisis se observó que la DM es 8 veces más actividad que la enzima silvestre a 50 °C (Fig. 1). Además, los resultados de la DSC indican que los biocatalizadores pueden degradar tanto la región cristalina como la amorfa dependiendo de la temperatura de reacción (Tabla 1). Los cambios conformacionales (gauche o trans) en el EG por efecto de la temperatura podrían influir en la especificidad de las enzimas hacia el PA y PB, se requieren más pruebas para comprobar esta hipótesis.

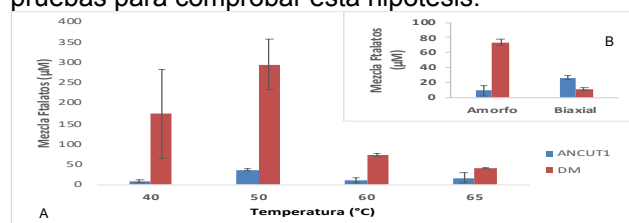


Fig. 1. Efecto de la actividad enzimática de las cutinasas a diferentes temperaturas sobre PA (A) y sobre el tipo de PET (B) a 60 °C. Promedio de 3 réplicas.

Tabla 1. Cambios en la cristalinidad después del tratamiento enzimático para observar la actividad de las enzimas hacia las regiones amorfas o cristalinas del PET.

| | 40 °C ^{PA} | 50 °C ^{PA} | 60 °C | | 65 °C ^{PA} |
|--------|---------------------|---------------------|-------|-------|---------------------|
| | | | PA | PB | |
| Blanco | 9.71 | 7.31 | 10.18 | 34.36 | 11.05 |
| ANCUT1 | 9.32 | 10.07 | 9.74 | 54.06 | 9.39 |
| DM | 2.26 | 8.79 | 9.35 | 34.96 | 9.35 |

Conclusiones. La ingeniería de la enzima a partir de herramientas computacionales condujo a la obtención de un biocatalizador que es 8 veces más activo que la enzima silvestre bajo las condiciones de reacción evaluadas. Los resultados sugieren que las enzimas necesitan ser termoestables en la temperatura de transición vítrea del PET (65-80 °C), ya que hay un descenso en la actividad hidrolítica. La actividad de las enzimas depende también del tipo de sustrato.

Agradecimiento. PAIP 5000-9095, PAPIIT IN 201921 DGAPA, beca CONACYT 750551

Bibliografía. (1) Aguilar, J, et al. (2022) *Micropl. & Nanopl.* 2(9), 1-15. (2) Tournier, V, et al. (2020). *Nature*. Vol (580). 1-18. (3) Castro, A, Rodríguez, R y Farrés, A. (2023). *Catalysts*. 13, 591. 1-24. (4) Morales, S. (2018). Tesis de Maestría, UNAM. (5) Lovera, D y Torres, K. (2020). Tesis de licenciatura, UNAM.

Estudio de la termoestabilidad de la cutinasa recombinante I de *Aspergillus nidulans* (ANCUT1) expresada en *Escherichia coli*

Karla Fernanda Ramírez González*, Adela Rodríguez Romero*, Rogelio Rodríguez Sotres, Amelia Farrés a UNAM * Facultad de Química • Instituto de Química, Ciudad de México, C.P. 04510, fernanda.rg@ciencias.unam.mx

Palabras clave: termoestabilidad, biodegradación, cutinasas

Introducción. Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son serin esterases cuyos sitios activos se encuentran abiertos, lo cual permite que actúen sobre una amplia variedad de sustratos incluyendo ácidos grasos solubles, triglicéridos, poliésteres insolubles como la cutina e incluso, el tereftalato de polietileno (PET)^{1,2}. Este último representa un desecho recalcitrante que ha generado una grave contaminación ambiental, la cual es necesario abordar y resolver, para lo que las cutinasas resultan una solución interesante, pero su actividad eficiente depende, entre otros factores, de que tengan actividad cerca de la temperatura de transición vítrea del PET (65°C en solución), pues es cuando aumenta la flexibilidad de las cadenas del polímero y la enzima tiene mayor acceso para despolimerizarlas.

Debido a esto, en el presente se trabajó con el objetivo de aumentar la termoestabilidad de una cutinasa, así como de encontrar un sistema competitivo para producirla.

Metodología. Se trabajó con un modelo de la cutinasa I de *Aspergillus nidulans* (ANCUT1) generado con AlphaFold por el Dr. Rogelio Rodríguez-Sotres y por medio de un diseño basado en secuencia³, usando como referencia la cutinasa termoestable de *Humicola insolens* (HiCut) y considerando un análisis de $\Delta\Delta G$, se propuso una variante con potencial de mayor termoestabilidad (K53I). Se produjeron las enzimas nativa y variante por primera vez en *Escherichia coli* y se realizó su caracterización térmica, determinando su actividad residual y temperatura de actividad máxima hacia p-nitrofenil butirato (pNPB).

Resultados. Se obtuvieron exitosamente las enzimas silvestre y nativa en el sobrenadante del cultivo, lo cual permitió realizar la caracterización térmica, donde se observó un aumento en la actividad residual de la variante en comparación con la nativa a temperaturas de 60-90°C. Además, se encontró un aumento en la temperatura de mayor actividad de la enzima variante, de 55°C en la enzima silvestre a un rango de 65-75°C para la variante.

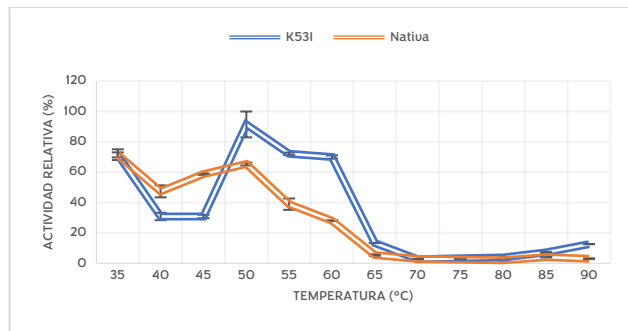


Fig. 1. Comparación de actividad residual hacia pNPB de ANCUT1 nativa y K53I después de 60 minutos en temperaturas de 35 a 90°C. Valores obtenidos del promedio de tres repeticiones.

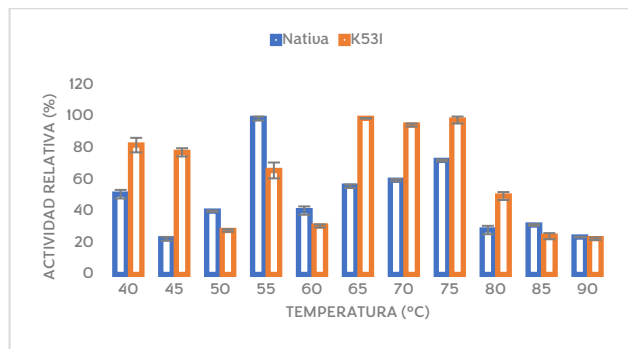


Fig. 2. Actividad de ANCUT1 nativa y variante hacia pNPB en función de la temperatura, de 40-90 °C. Valores obtenidos del promedio de tres repeticiones.

Conclusiones. Se demostró que *E. coli* es un modelo adecuado para la expresión extracelular de ANCUT1 y que la sustitución de un residuo cuidadosamente elegido genera una variante de ANCUT1 con mayor termoestabilidad que su contraparte nativa.

Agradecimiento. Este proyecto se realizó con el apoyo financiero del CONACYT (beca de maestría, CVU: 929805), PAPIIT 2019 21 y PAIP 5000-9095.

Bibliografía.

- Dong, Q., Yuan, S., Wu, L., Su, L., Zhao, Q., Wu, J. & Zhou, J. (2020). *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 1-9.
- Yang, Y., Min, J., Xue, T., Jiang, P., Liu, X., Peng, R., & Guo, R. T. (2023). *Nature Communications*, 14(1), 1645.
- Ma, Y., Evans, D., Logue, S., & Langridge, P. (2001). *Molecular Genetics and Genomics*, 266(3), 345-352.

Comparación de la expresión de la globulina 11S de amaranto modificada con péptidos antihipertensivos en dos cepas de *E. coli*

María José Caracheo Espinosa¹, Janet G. Jara-Romero¹, Silvia Luna Suárez¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, México. 90700. silvials2004@yahoo.com.mx, sluna@ipn.mx.

Palabras clave: Globulina 11S amaranto, péptidos bioactivos, expresión.

Introducción. La globulina 11S o amarantina es una proteína de reserva del amaranto presente de manera mayoritaria en este con 18% de la proteína total del grano y un 90% del total de globulinas, cuenta con buenas propiedades nutricionales gracias a la presencia de aminoácidos esenciales además de ser estable a altas temperaturas. Esta conformada por 2 subunidades; ácida y básica, unidas a través de 2 puentes disulfuro, la subunidad ácida demostró potencial para que se le realizaran modificaciones que mejoraran sus propiedades nutraceuticas al insertar péptidos bioactivos en tándem dando lugar a una serie de proteínas modificadas en las regiones hipervariables de la misma siendo una de ellas la amarantina R1 la cual cuenta con 4 péptidos VY, el objetivo de este proyecto fue:

Realizar una comparación en la expresión de la Globulina 11S R1 en tres cepas de *Escherichia coli* diferentes BL21 CodonPlus RIL (DE3), Origami (DE3) y BL21 Star (DE3).

Metodología. A partir de la construcción del vector Pet-AMAR-R1-6 His se transformó a BL21 star (DE3) y a Origami (DE3) por choque térmico y se seleccionaron placas de LB con ampicilina 100 µg/mL. La expresión se llevó a cabo en 5 mL de medio LB el cual fue inoculado con 0.25% del preinóculo e incubado a 37°C hasta alcanzar una D.O de 0.3-0.4, la inducción de la proteína se llevó a cabo con lactosa al 0.3% y se continuó el crecimiento. Se tomó 1 mL de muestra a las 0, 1.5, 3 y 6 horas, estas fueron centrifugadas, la biomasa recuperada fue almacenada a -20°C para realizar la posterior comparación de la expresión de la proteína con BL21 CodonPlus (DE3) RIL a través de SDS-PAGE.

Resultados. Los datos para la comparación con la cepa Codon Plus (DE3) RIL fueron obtenidos de la tesis doctoral del doctor Edgar Espinosa Hernández³ los cuales se observan en la tabla 1.

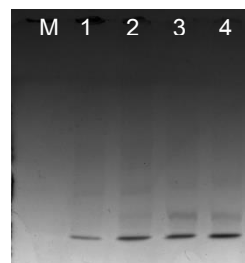


Fig. 1. Expresión de la Globulina 11S del amaranto en BL21 Star (DE3) observadas en un gel SDS PAGE al 10%. Carril: M, marcador de peso molecular; 1, 0 h de expresión; 2, 1.5 h; 3, 3 h; 4, 6 h.

Tabla 1. Comparación en el rendimiento de la cepa Origami (DE3)

| | | Origami (DE3) | Star (DE3) | Codon Plus (DE3) RIL |
|------------------|------|---------------|------------|----------------------|
| Rendimiento mg/L | 6 h. | - | 60 | 135 |
| | 3 h. | 12 | 40 | 75.3 |

Conclusiones. Las características con las que cuenta la cepa BL21 Codon Plus (DE3) RIL parecen ser las más adecuadas para la expresión de la proteína Globulina 11S R1 del amaranto de entre las 3 cepas utilizadas ya que cuenta con tRNAs poco comunes para *E. coli* específicamente para los aminoácidos R, I, L y P. Por otro lado, las características de la cepa BL21 Star (DE3) parecen ser más eficientes que la cepa Origami y esto puede ser debido a su capacidad para promover la estabilidad del RNA mensajero. A pesar de que la cepa Origami (DE3) cuenta con condiciones oxidantes en el citoplasma que permite la formación de puentes disulfuro el rendimiento fue el menor entre las cepas además de que la acumulación proteica disminuía para la hora 6 posiblemente debido a la degradación proteolítica.

Agradecimiento. A CONAHCYT por la beca y a la SIP-IPN Por el financiamiento del proyecto

Bibliografía.

- Luna-Suárez S., y col. (2010) J Biotechnol 148 (2): 240-247.
- Espinosa-Hernández E., y col (2019) J Biotechnol 37: 18-24
- Espinosa-Hernández E., (2019) Inserción de péptidos bioactivos en las regiones variables de una globulina 11S de amaranto. Tesis de doctorado. CIBA-IPN.

MODELADO DE LA ESTRUCTURA 3D DE UNA PROTEASA OBTENIDA DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LACTOSUERO CON *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* POR MÉTODOS *IN SILICO*

Luis Fernando Patlan Velazquez¹, Carlos Jiménez-Pérez¹, Luis G. González-Olivares², Sergio Alatorre-Santamaría¹, Mariano García-Garibay^{1,3}, Lorena Gómez-Ruiz¹, Francisco Guzmán-Rodríguez¹, Gabriela Rodríguez-Serrano¹, Alma Cruz-Guerrero¹

¹Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, CDMX, C.P. 09340. ²Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, C.P. 42067, ³Departamento de Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Edo. de México, 52006. ibi.cjimenez@xanum.uam.mx

Palabras clave: proteasa, modelado, in silico

Introducción. El lactosuero es uno de los principales subproductos de la industria láctea que tiene un gran potencial de uso dado su contenido en proteínas y lactosa, por lo que se ha investigado su aprovechamiento fermentándolo con bacterias ácido-lácticas (BAL) para obtener péptidos bioactivos y otros compuestos de interés¹. Sin embargo, el mecanismo de proteólisis de muchas BAL cuando crecen en este medio apenas se está comenzando a elucidar².

El objetivo de este trabajo fue modelar la proteasa (PrtB) que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* expresa al crecer en lactosuero mediante herramientas *in silico*, lo que permitirá comprender más sobre su mecanismo proteolítico.

Metodología. Primeramente, se parte de la secuencia de aminoácidos reportada³ para la proteasa (PrtB) de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (cepa 2038) y se ingresa a la base de datos *UniProt* (F0K2N5) para seleccionar los residuos del dominio catalítico de la misma (res 213-679) como estructura primaria. Con esta se procedió al modelado empleando dos programas que se basan en la homología de las secuencias: *SWISS-MODEL* e *I-TASSER*. A continuación, las características estructurales de cada modelo se analizaron empleando el programa *UCSF Chimera* (Version 1.15). Finalmente, la estabilidad del modelo se optimizó mediante dinámica molecular (DM) durante 200 ns considerando tres valores de pH (6.5, 5.5 y 4.5) esperados en el crecimiento de la bacteria en lactosuero, empleando el programa *NAMD2*.

Resultados. Los dos programas diseñaron el modelo de PrtB a partir de su estructura primaria, tomando como template la estructura del dominio catalítico de la proteasa ScpA de *Streptococcus pyogenes* (PDB 7bj3). En la Fig. 1A se puede observar la sobreposición de las estructuras PrtB y ScpA. La elección de este template se debió a las similitudes por filogenia entre *S. pyogenes* y *L. delbrueckii*, además de que ambas enzimas son del tipo serina proteasa.

De la misma sobreposición se determinó la triada catalítica de PrtB a partir de la reportada para ScpA, que resultó ser del tipo Asp/Ser/His. Como puede verse

en la Fig. 1B la posición de los residuos de la triada catalítica se conserva en ambas proteasas.

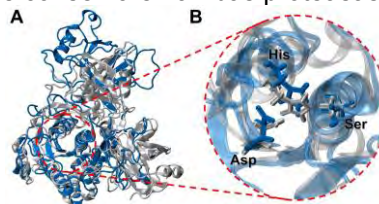


Fig 1. (A) Comparación de las estructuras PrtB (azul) y ScpA (gris). **(B)** Sobreposición de los residuos de la triada catalítica de PrtB (azul) y de ScpA (gris).

Se analizaron con los descriptores *RMSD* y *RMSF* el modelo de PrtB de *L. delbrueckii* optimizado por DM. Las trayectorias de los 200 ns permiten predecir la estabilidad de la estructura y estas mostraron que las regiones más definidas de la estructura tuvieron cambios mínimos de posición durante toda la trayectoria, corroborando la eficacia del modelado. Asimismo, se observó que los residuos de la triada catalítica se mantuvieron estables a pH 4.5 y 5.5, sin embargo, tuvieron fluctuaciones importantes a 6.5. Esto coincide con lo reportado para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante su crecimiento en otros medios, donde su pH óptimo es 5.5. Los resultados teóricos permiten predecir a que pH durante la fermentación de *L. delbrueckii* en lactosuero la proteasa estará activa.

Conclusiones. Se logró obtener una estructura tridimensional de la proteasa PrtB de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* expresada durante su crecimiento en lactosuero, cuya triada catalítica coincide con la de la proteasa ScpA. Esta proteasa mostró mejor estabilidad a pH de 4.5 y 5.5, lo que permite conocer mejor el proceso de proteólisis de esta bacteria para posibles aplicaciones.

Bibliografía.

1. Chourasia, R., Chiring-Phukon, L., Minhajul-Abidin, M. Padhi, S., Singh, S., Kumar-Rai, A. (2022) *Bioresour. Technol. Rep.* 19: 101144
2. Zhang, S., Wu, L., Zhang, Y., Zhang, J., Cheng, H., Liu, Y., Kang, Z., Zhang, L. (2023) *Int. Dairy J.* 137: 105513.
3. Liu, E., Zheng, H., Hao, P., Konno, T., Yu, Y., Kume, H., Oda, M. (2012) *Curr Microbiol.* 65: 742-751.

**CU(II) BINDING TO TRUNCATED PRION PROTEIN: BRIDGING THE GAP BETWEEN
EPR SPECTROSCOPY AND DFT CALCULATIONS**

Adán Martínez^a, Yanahi Posadas^b, Victor López^b, Alberto Vela^a and Liliana Quintanar^a.

^aDepartment of chemistry and ^bdepartment of physiology, biophysics and neurosciences. Center for research and advanced studies (CINVESTAV), Mexico City, 07360. e-mail:

michael.martinez@cinvestav.mx

Keywords: Prion protein, Alzheimer's disease, Density Functional Theory (DFT)

Introduction.

Cellular Prion protein (PrP) is a Cu-binding protein able to coordinate up to six copper ions. Copper binding sites are located at its N-terminal intrinsically disordered region. Four Cu(II) ions bind at the octarepeat region spanning residues 60 - 91, while the other two Cu(II) ions can be anchored at His96 and His111 respectively. His111 binds Cu(II) through imidazole group and deprotonated amides from the peptide bonds that precede i.e. Met109, Lys110. These coordination properties are found in the full-length prion protein; however, when PrP suffers endoproteolytic alpha-cleavage at the Lys110/His111 site, the protein lacks the amide groups that are known to participate in copper coordination to the His111 site[1].

Since alpha-cleavage is the main proteolytic event of PrP, and Cu binding is an important feature of this protein, it becomes relevant to explore how alpha-cleavage processing might impact the Cu(II) coordination properties of PrP at the His111 site.

Methodology.

As a first approximation, the fragment HMAGA was used as a model to elucidate the coordination properties of PrP at the His111 site. Electronic structure calculations were carried out in the ORCA program system[2]. The PBE functional was employed for the optimization and frequency calculations of the complexes in the gas phase. After that, the g and A tensors were calculated with the PBE0 functional[3].

Results.

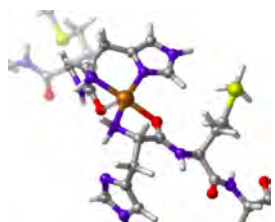


Fig. 1. Optimized gas phase geometry of the Ternary complex $[Cu(HMAGA)_2]^{2+}$.

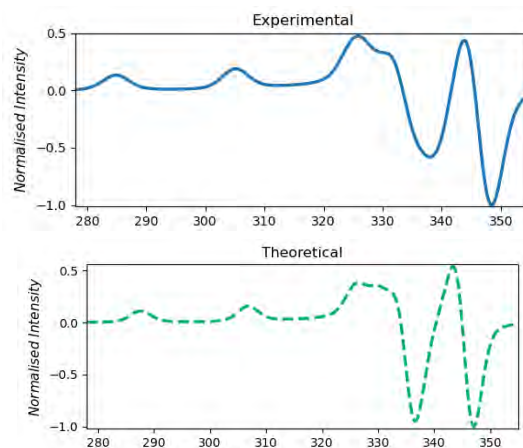


Fig. 2. Top: Experimental EPR spectrum of the fragment HMAGA with Cu(II)[3]. Bottom: Theoretical EPR spectrum obtained with the functional PBE0 corresponding to the ternary complex $[Cu(HMAGA)_2]^{2+}$.

Conclusions.

The electronic structure calculations with DFT allow to establish the coordination of Cu(II) with the HMAGA fragment, which in this case is 3N, 2O. The EPR parameters calculated with the PBE0 functional, are in good agreement with the EPR spectrum obtained experimentally. Other conformations were examined as well, however, for reasons of space they are not included in this abstract.

Acknowledgement: to CONAHCyT for the postdoctoral fellowship with number 2753105.

Bibliography.

- [1] Sánchez C., Fernández C., Quintanar L. Neuroprotective alpha-cleavage of the human prion protein significantly impacts Cu(II) coordination at its His111 site. (2018) *Dalton Trans.* 47: 9274 - 9282.
- [2] Neese F. The ORCA program system. (2012) *WIREs Comput. Mol. Sci.*, 2: 73 - 78.
- [3] Adamo C., Barone V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. (1999) *J. Chem. Phys.* 110: 6158-6170.

DESCRIPCIÓN DE EPÍTOPES ESPECIE-ESPECÍFICOS DE ARGININA CINASA DE GARRAPATA CAFÉ (*Rhipicephalus sanguineus*)

Karina D. García-Orozco, Ana C. Gómez-Yanes, Rogerio R. Sotelo-Mundo

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas núm. 46, Ejido a La Victoria, Hermosillo, Sonora, 83304, México.

orozco@ciad.mx

Rhipicephalus sanguineus, arginine kinase, epitopes, spotted fever

Introducción. La garrapata café, *Rhipicephalus sanguineus*, es portadora de la bacteria *Rickettsia rickettsii*, responsable de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (RMSF), una enfermedad con una tasa de mortalidad del 40-45% [1]. Dada la creciente presencia del vector en las Américas y su potencial para transmitir otras enfermedades, es imperativo comprender la respuesta inmune a su picadura. Descubrir un biomarcador de exposición podría facilitar la identificación de áreas con una mayor tendencia a contraer RMSF, lo que permitiría adoptar medidas de control de vectores específicas. La arginina quinasa (AK) es un alérgeno de invertebrados conocido, que ha demostrado tener una alta antigenicidad y es potencial un biomarcador de exposición.

Hasta donde sabemos, los fosfógenos aún no se han propuesto como marcadores para la vigilancia de vectores y merecen una mayor consideración.

Metodología. Mediante un análisis de la estructura de AK de garrapata PDB 7RE6, se predijeron epítomos específicos de RsAK con DiscoTope 2.0 [2]. El epítomo ubicado dentro de los residuos 105-109, 240,241, 334, 337 y 340 se identificó como el epítomo conformacional E1. Se realizó la expresión recombinante y purificación de RsAK (WT). El epítomo E1 se mutó a residuos de alanina, se sintetizó y clonó en el vector pET11a para su sobreexpresión en *E. coli* mediante un gen sintético. Los detalles sobre la expresión y purificación de proteínas recombinantes, así como la actividad específica se han documentado previamente [3].

Resultados.

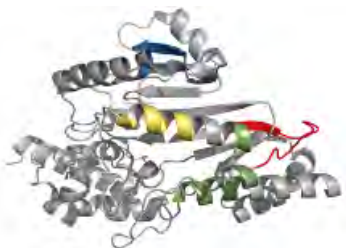


Fig. 1. Predicción de epítomos especie específicos de arginina cinasa de *Rhipicephalus sanguineus* (RsAK). En verde se indica el epítomo E1

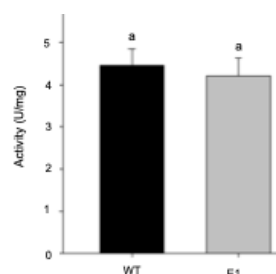


Fig. 2. Actividad en U/mg de la arginina cinasa WT y de la mutante E1.

Conclusiones. La mutante E1 de arginina cinasa de garrapata presenta una menor actividad enzimática que la silvestre WT. Por otro lado, también estudiamos el reconocimiento de ambas proteínas recombinantes con sueros de pacientes diagnosticados con RMSF. Nuestro objetivo es establecer un ensayo que permita evaluar la exposición de la población al vector, mediante la respuesta inmune a RsAK. La definición de un epítomo mediante mutagénesis a alanina soporta que existe un reconocimiento específico via IgG y su uso como biomarcador antigénico de garrapatas.

Agradecimiento. Agradecemos a CONAHCYT (proyecto CB-2019-241-610264) y a CIAD por el financiamiento.

Bibliografía.

[1] Álvarez-López DI, Ochoa-Mora E, Heitman KN, Binder AM, Álvarez-Hernández G, Armstrong PA. Epidemiology and Clinical Features of Rocky Mountain Spotted Fever from Enhanced Surveillance, Sonora, Mexico: 2015–2018. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2021;104(1):190–7.

[2] Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci*. 2006 Nov;15(11):2558-67.

[3] Gomez-Yanes AC, Moreno-Cordova EN, Garcia-Orozco KD, Laino A, Islas-Osuna MA, Lopez-Zavala AA, et al. The Arginine Kinase from the Tick *Rhipicephalus sanguineus* Is an Efficient Biocatalyst. *Catalysts*. 2022;12(10):1178.

ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE UNA BIBLIOTECA DE REGIONES INTRÍNECAMENTE DESORDENADAS

Samantha Barron Huerta, Constanza Enriquez Toledo, César Ponce Diego, Cesar L. Cuevas-Velazquez, Departamento de Bioquímica Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510,

Palabras clave: Regiones intrínsecamente desordenadas, estrés hiperosmótico, FRET

Introducción. Las regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) son dominios proteicos altamente dinámicos y estructuralmente inestables que se comportan como un ensamble de conformaciones, transitando del desorden al orden según los cambios en el ambiente. Esta respuesta estructural se denomina sensibilidad, y es por medio de ella que las células podrían resistir diferentes tipos de estrés. La sensibilidad estructural a estrés hiperosmótico se caracterizó por ensayos FRET (Forster Resonance Energy Transfer) para 188 de estas IDRs en conjunto con sus propiedades fisicoquímicas.

El objetivo de este trabajo fue determinar si existían diferencias en las propiedades de las IDRs que expliquen su comportamiento en relación a la sensibilidad al choque hiperosmótico.

Metodología. En lenguaje R se hizo un análisis de componentes principales (PCA) de las propiedades fisicoquímicas de las IDRs. Con aquellos que retienen mayor información de la varianza de la biblioteca se realizaron pruebas de Wilcoxon para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las secuencias de respuesta alta y baja.

Resultados. A partir de los resultados del PCA, concluimos que los parámetros que mejor representan la varianza del 82% de las secuencias en la biblioteca son el punto isoeléctrico (pI), el porcentaje de alfa hélice, la hidropatía y kappa.

Por las pruebas de Wilcoxon se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las IDRs de respuesta alta y baja respecto al valor medio del porcentaje de hélice. Pero sí las hay en los 3 parámetros restantes. El parámetro en relación al cual son más distintas entre sí es kappa, luego le sigue la hidropatía y finalmente el pI.

Según lo anterior, la sensibilidad estructural al choque hiperosmótico depende en gran medida de las posiciones y cargas de los aminoácidos (esto se cuantifica por el parámetro kappa, entre menor es su valor mejor la distribución de cargas) y de la hidropatía. Ambos parámetros son fundamentales para definir un umbral entre los estados expandidos

de los plegados que adquieren las proteínas. Se espera entonces que la generalidad de IDRs sensibles a choque hiperosmótico tengan un kappa e hidropatía bajos.

Fig. 1. Gráficos de violín de kappa e hidropatía.

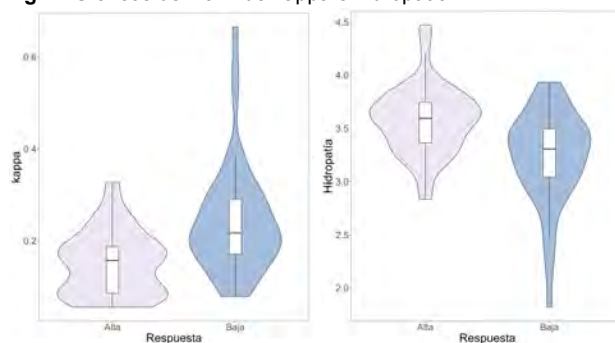


Tabla 1. Medias de los parámetros fisicoquímicos y valor de p de cada prueba estadística.

| Clasf. | pI | %Hélice | Hidropatía | kappa |
|--------|------|---------|------------|---------|
| Alta | 7.30 | 7.51 | 3.58 | 0.151 |
| Baja | 8.36 | 10.7 | 3.23 | 0.244 |
| p | 0.03 | 0.94 | 6.31e-5 | 9.27e-6 |

Conclusiones. Las diferencias encontradas en el análisis estadístico de las propiedades fisicoquímicas provee una base para comenzar a explicar el fenómeno de sensibilidad estructural al mismo tiempo que concuerda con los resultados encontrados por otros autores.

Agradecimiento. Financiamiento de PAPIIT-UNAM clave IA203422 y Ciencia de Frontera CONAHCYT clave 252952.

Bibliografía.

- Holehouse, A. S., Das, R., Ahad, J. N., Richardson, M. S., & Pappu, R. V. (2017). *Biophysical Journal* 112(1), 16–21
- Uversky, V. N. (2019). *Frontiers in Physics*. 7.
- Mao, A. H., Crick, S. L., Vitalis, A., Chicoine, C. L., & Pappu, R. V. (2010). *PNAS*. 107(18), 8183–8188.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ESTRUCTURAL DE LA URIDINA 5'-MONOFOSFATO SINTASA DE *Coffea arabica*

Lilian González-Segura¹, Alexis Hinojosa-Cruz¹, Adelaida Díaz-Vilchis² y Ángel Gabriel Díaz-Sánchez³. ¹Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad de México, 04510. ²Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, 62240. ³Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas, Cd. Juárez; 32310. lilgonzalezseg@gmail.com

Palabras clave: Pirimidinas, UMP, OPRTasa

Introducción. Los nucleótidos de purina y pirimidina son biomoléculas esenciales en todas las formas de vida, no solo como precursores de RNA y DNA, sino también son requeridos como cofactores del metabolismo energético y para la síntesis continua de polisacáridos, fosfolípidos y glicolípidos (1-2). Estos nucleótidos se pueden sintetizar a partir de rutas *de novo*, o del reciclado de nucleobases y nucleósidos preformados por rutas de recuperación (3). La biosíntesis de uridina 5' monofosfato (UMP) es una vía altamente conservada tanto en procariontes como en eucariotes. En eucariotes superiores y plantas, los dos últimos pasos en la biosíntesis *de novo* de UMP son catalizados por una proteína quimérica natural bifuncional llamada UMP sintasa (UMPS). Esta proteína bifuncional posee dos actividades catalíticas: la orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa) y la orotidina 5'-monofosfato descarboxilasa (ODCasa) (4). La OPRTasa cataliza la condensación del orotato (OA) con el fosforribosil pirofosfato (PRPP) dependiente de Mg²⁺ para producir PPI y la orotidina-5'-monofosfato (OMP), la cual es descarboxilada por la ODCasa para producir UMP, que es el nucleótido de entrada para la biosíntesis de todos los nucleótidos de pirimidina. En las plantas la porción del N-terminal de este polipéptido bifuncional corresponde a la OPRTasa, mientras que la región del C-terminal a la ODCasa (5). Aunque la UMPS es una enzima clave en la biosíntesis *de novo* de pirimidinas, en las plantas se han llevado a cabo muy pocos estudios.

El objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización bioquímica y estructural de la UMPS recombinante de *Coffea arabica* (CaUMPS).

Metodología. Se realizó la purificación de la proteína recombinante bifuncional CaUMPS. Se midieron las actividades enzimáticas de la OPRTasa y ODCasa de la CaUMPS, obteniéndose los diferentes parámetros cinéticos. Se determinó la estructura tridimensional de la ODCasa de *Coffea arabica* (CaODCasa) por cristalografía de rayos X y se obtuvo el modelo tridimensional de la OPRTasa de *Coffea arabica* (CaOPRTasa).

Resultados. La CaUMPS se obtuvo de forma recombinante soluble y en su estado nativo. Los parámetros cinéticos obtenidos para la CaOPRTasa y la CaODCasa de la CaUMPS son comparables con los observados para otras enzimas. Se determinó la estructura tridimensional del dímero de la CaODCasa a 1.4 Å de resolución. La CaODCasa tiene un plegamiento de barril TIM similar al que se ha encontrado en otras ODCasas. La unión de una molécula de 1-desoxi-ribofuranosa-5'-fosfato al sitio activo en una de las subunidades del dímero indujo una conformación cerrada, mientras que en la subunidad adyacente la ausencia de esta molécula llevó a una conformación abierta. La estructura tridimensional de la CaOPRTasa se modeló utilizando AlphaFold2. El modelo de la proteína puede dividirse en las tres regiones que se han definido para otras OPRTasas: el N-terminal, la región central y el C-terminal.

Conclusiones. La CaUMPS nativa es un dímero donde cada cadena polipeptídica está formada de un dominio de OPRTasa y otro dominio de ODCasa. La unión del ligando en el sitio activo de la CaODCasa promueve un cambio conformacional al estado cerrado, mientras que la subunidad adyacente puede estar en estado abierto. Este estudio contribuye a la elucidación del mecanismo de acción de una clase de enzimas quiméricas críticas para el metabolismo y la adaptación de las plantas.

Agradecimiento. Trabajo financiado por el PAPIIT-UNAM (IN227920, IN211223) y por el Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado PAIP (5000-9129) de la Facultad de Química, UNAM.

Bibliografía.

1. Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T.A., Ashihara, H. (2003) *J. Plant Physiol.* 160: 1271–1295.
2. Kafer, C., Zhou, L., Santoso, D., Guirgis, A., Weers, B., Park, S., Thornburg, R. (2004) *Front. Biosci.* 9: 1611–1625.
3. Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T.A., Ashihara, H. (2003) *J. Plant Physiol.* 160: 1271–1295.
4. Santoso, D., Thornburg, R. (1998) *Plant Physiol.* 116: 815–821.
5. Maier, T., Zhou, L., Thornburg, R. (1995) *Plant Physiol.* 108: 1747.

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA BRAZEÍNA MODIFICADA EN *Pichia pastoris*

Jacqueline Meneses Pérez ¹, Jocksan I. Morales Camacho², Silvia Luna Suárez ¹,
¹Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada CIBA-IPN, Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, México, C.P. 9070 ²Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas UDLAP Puebla, San Andrés Cholula, Puebla C.P 72810
silvials2004@yahoo.com.mx, sluna@ipn.mx

Palabras clave: Brazeína, edulcorante, expresión, Pichia pastoris

Introducción. Una de las proteínas que tiene la característica de dar un sabor dulce debido a la interacción con el receptor del sabor dulce TIR2 y TIR3 es la proteína brazeína proveniente de la planta *Pentadiplandra brazzeana*. Esta proteína ha sido reportada como 3000 veces más dulce que la sacarosa, no obstante, al ser una proteína obtenida en poca cantidad y obtenerla de manera natural a escalas mayores para su aplicación como edulcorante, se han buscado nuevas alternativas como son las proteínas recombinantes. El objetivo de este trabajo fue expresar brazeína modificada en la levadura *Pichia Pastoris*.

Metodología. Primero se realizó un análisis in silico de la interacción de la proteína con el receptor del sabor dulce TIR1 TIR3, el diseño del plásmido que contenía el gen de la brazeína con las 3 modificaciones en los aminoácidos 7, 9 y 51. posteriormente se realizó la transformación con LiCl en la levadura *Pichia pastoris* (1), las colonias transformadas se verificaron por PCR y las colonias positivas se utilizaron para llevar a cabo ensayos de expresión utilizando metanol al 2 % (2).

Resultados. De acuerdo con el acoplamiento en la figura 1 y 2 se observa que la brazeína con 3 modificaciones se une con el receptor dulce en ambas subunidades TIR2 y TIR3, demostrando que tanto el dominio VFTM de T1R2 como el VFTM de TIR3 son importantes para la activación de la brazeína.

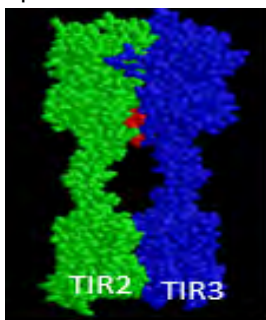


Fig. 1. Acoplamiento de brazeína con 3 mutaciones y el receptor del sabor dulce TIR2- TIR3.

La mejor expresión de la proteína se llevó a cabo utilizando una concentración de metanol al 2% (figura 2 y 3) siendo a las 72h y 96 h después de la inducción en la cual se observa la mayor expresión de la proteína, alcanzando una concentración de 276 mg/L (3).

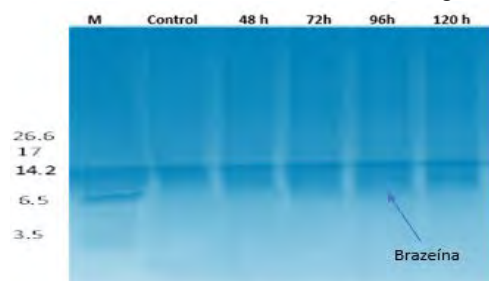


Fig. 2. Expresión de brazeína a diferentes tiempos de inducción comparadas con el control (sin inducción con metanol)

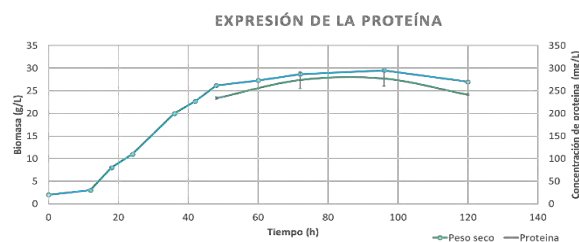


Fig. 3. Expresión de la proteína y contenido de biomasa de la fermentación a diferentes tiempos.

Conclusiones.

Los análisis de acoplamiento molecular indican que la proteína interactúa con el receptor TIR2 y TIR3 activando así el sabor dulce.

La mayor expresión de la proteína se da a las 96 horas después de la inducción con metanol al 2% obteniendo un rendimiento de 276 mg/L.

Agradecimiento.

A conahcyt por la beca de maestría

Bibliografía.

1. Kumar, S., Mannil, A., & Mutturi, S. (2020). *Protein Expression and Purification*, (174), 105685.
2. Wang, X., Zhu, M., Yang, G., Su, C., Zhang, A., Cao, R., & Chen, P. (2011). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2(4), 655-660.
3. Neiers, F., Belloir, C., Poirier, N., Naumer, C., Krohn, M., & Briand, L. (2021). *Life*, 11(1), 46

ANÁLISIS IN SILICO DE LIPASAS DEL TERMÓFILO *NEOBACILLUS THERMOCOPRIAE* C255

Graciela Espinosa Luna, Rosa María Oliart Ros, Instituto Tecnológico de Veracruz, Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Veracruz, Ver. 91897, graciespinosa57@mail.com.

Lipasas, termófilo, genoma.

Introducción. El eje volcánico Transmexicano es una fuente de microorganismos termófilos, por sus volcanes, aguas termales y suelos geotérmicos (1). La cepa C255 identificada molecularmente como *Neobacillus thermocopriae* fue aislada de ceniza del volcán Popocatepetl. Esta cepa creció de manera óptima a 55 °C, expresó actividad lipolítica en medios con rodamina y tributirina y un extracto enzimático crudo obtenido por lisis celular hidrolizó el *p*-nitrofenil laurato. Las lipasas y carboxilesterasas, libres e inmovilizadas, son de interés biotecnológico en la síntesis de aromas y biodiesel, así como en las industrias textil, farmacéutica y de alimentos (2). El objetivo de este trabajo fue hacer el análisis in silico de las lipasas de *Neobacillus thermocopriae* C255, encontradas por la secuenciación de su genoma.

Metodología. A partir del aislamiento, identificación molecular y hallazgo de actividad lipolítica en la cepa C255, se procedió a extraer su ADN para la secuenciación genómica. La secuenciación fue realizada con Illumina, el ensamblado con SPADES y la anotación con RAST. Derivado de la anotación, se seleccionaron los genes que codificaran para lipasa o carboxilesterasa. Con la estructura primaria se determinaron parámetros fisicoquímicos, se identificaron dominios y se predijo el modelo tridimensional de novo con AlphaFold.

Resultados. Se seleccionaron tres enzimas designadas: MglC255 (lipasa), CaesC255 y GdsIC255 (carboxilesterasas). Las características derivadas del análisis in silico de su estructura primaria se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de las lipasas según el análisis de su estructura primaria.

| | CaesC255 | GdsIC255 | MglC255 |
|----------------|--------------------------|---|--------------------------|
| Residuos | 248 | 274 | 267 |
| Peso Molecular | 28.5 kDa | 31.3 kDa | 31.1 kDa |
| pI | 5.79 | 4.78 | 6.38 |
| Péptido señal | No | 1-21 | No |
| Ubicación | Intracelular | 1-17 transmembrana 18-274 extracelular | Intracelular |
| PFAM | 12146 | 13472 | 12146 |
| Dominios | α/β hidrolasa | 1-18 unión a lípidos 55-245 tipo GDSL | α/β hidrolasa |

Se realizó la predicción de residuos hidrofóbicos en el modelo tridimensional, la identificación del plegamiento canónico de α/β hidrolasa característico de las lipasas y la posible ubicación de los residuos catalíticos. La predicción de los modelos se muestra en la Figura 1.

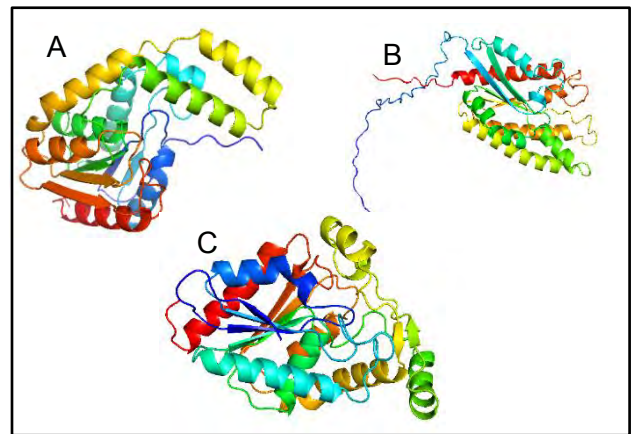


Fig. 1. Predicción del modelo tridimensional de las lipasas analizadas. A) CaesC255, B) GdsIC255 y C) MglC255

Conclusiones. a) Las enzimas seleccionadas coinciden con la descripción molecular para enzimas lipolíticas por lo que son candidatas para la clonación y expresión heteróloga. b) Los oligonucleótidos para amplificar y clonar la GdsIC255 no deberán incluir el péptido señal porque la región de afinidad a lípidos se presenta como desordenada, no pertenece al dominio catalítico y podría interactuar desfavorablemente con la membrana de *E. coli*. c) El trabajo siguiente será obtener las enzimas recombinantes, caracterizarlas y probarlas en reacciones de síntesis.

Agradecimiento. G.E.L. agradece la beca E.P.M. 2022(3) otorgada por el CONAHCyT.

Bibliografía.

- Ferrari, L. (2000). Avances en el conocimiento de la Faja Volcánica Transmexicana durante la última década. *Boletín de la sociedad geológica mexicana*, 53(1), 84-92.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial cell factories*, 19, 1-42.

Diseño de variantes de leptina con afinidad a Ob-R mejorada para tratamiento de obesidad

Gabriel Ivan Ortega López, ENMyH del IPN, SEPI, Laboratorio de Bioquímica y fisicoquímica de proteínas. GAM, Ciudad de México, C.P. 07320. Responsable: D. en C. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza, cbenitezc@ipn.mx.

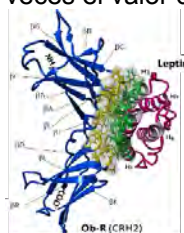
Palabras clave: leptina, afinidad y obesidad

Introducción. La leptina es una proteína de 146 aminoácidos que actúa como hormona generando efectos anorexigénicos, saciando el apetito e incrementando el gasto calórico. La leptina está formada por 4 α -hélices antiparalelas que forman un núcleo hidrofóbico y una topología de lazo anudado (1). La actividad de la leptina está en función de la estabilidad estructural que está directamente relacionado con la formación de su único enlace disulfuro entre la cisteína 96 y 146. El sitio de unión 2 de leptina (α -hélice 1 y 3) se une al LBD del ObR, formando un complejo heterodímero. Se han reportado datos termodinámicos del complejo leptina-ObR a partir de ensayos de inhibición competitiva, calorimetría de titulación isotérmica, RMN y resonancia de plasmón de superficie (2 y 3). En este trabajo se utilizó esa información y tecnología de IA para diseñar racionalmente mutantes de leptina que podría optimizar la interacción de la leptina con su receptor (Ob-R). Además, se realizaron predicciones del efecto de mutaciones puntuales en la interfaz del sitio 2 de unión de leptina en complejo con el receptor, y evaluamos el ΔG_b , $\Delta\Delta G_b$, K_a , K_d .

Metodología. La interfaz del modelo del complejo leptina-receptor en formato .pdb se analizó con PDBEPIsa. Con los servidores BeAtMuSiC ubicamos aminoácidos altamente reactivos (hot-spot) en la interfaz del sitio de unión 2 de leptina para descartar mutaciones no relevantes y con FoldX se construyeron los modelos del complejo, con las mutaciones puntuales sobre leptina y evaluamos el ΔG_b en condiciones estándar (pH de 7, I de 0.15 M y 298 K) con el software FoldX y a partir de estos datos calculamos el $\Delta\Delta G_b$, K_a y K_d para cada complejo.

Resultados. En el modelo 3D del complejo leptina-receptor de la figura 1, se resaltan los aminoácidos que participan en la interacción, involucrado las α -hélices 1 y 3 de la leptina y los loops entre las hojas β AB, CD, FG, IJ, KL y OP. Encontramos varios cambios de secuencia que podrían mejorar la unión del complejo leptina-ObR, en las α -hélices 1 y 3, respectivamente. La tabla 1 muestra como la variante denominada GOL6 mostró potencial biotecnológico (como agonista o

antagonista) con valor de $\Delta\Delta G_b$ igual a -2.46 kcal/mol) de acuerdo con FoldX (4), y también incremento 60 veces el valor de K_a con respecto a la WT.



Posición y características de mutaciones en leptina que mejoran la unión del complejo leptina-ObR

| Mutación | $\Delta\Delta G_b$ (kcal/mol) | Posición | AA ^{WT} | AA ^{MUT} |
|----------|-------------------------------|----------|------------------|-------------------|
| GOL1 | -0.92 | Hélice 1 | cargado - | Aromático |
| GOL2 | -0.80 | | cargado - | Aromático |
| GOL4 | -0.85 | Hélice 3 | cargado - | Aromático |
| GOL5 | -0.70 | | cargado - | Alifático |
| GOL6 | -0.91 | | cargado - | Aromático |
| GOL7 | -0.81 | | Polar | Aromático |
| GOL12 | -1.07 | | Polar | Aromático |
| GOL13 | -0.84 | Polar | Aromático | |

Fig. 1. Izq. Modelo 3D del complejo leptina-ObR (magenta y azul, respectivamente). En amarillo y verde se muestran los aminoácidos que participan en la interacción del ObR y la leptina, respectivamente. Der. Se muestran las posiciones y características de las mutaciones sobre las α -hélices 1 y 3 de la leptina que mejoran la unión del complejo.

Tabla 1. ΔG_b , $\Delta\Delta G_b$, K_a , K_d , del complejo leptina-ObR con diferentes mutaciones en leptina a pH 7, I de 0.15 M y T de 298 K

| Variante | ΔG_b (kcal/mol) | $\Delta\Delta G_b$ (kcal/mol) | K_d nM | K_a M ⁻¹ ($\times 10^{10}$) |
|----------|-------------------------|-------------------------------|----------|--|
| WT | -13.073 | 0.00 | 0.254 | 0.392 |
| W100E | -13.1593 | -0.08 | 0.219 | 0.454 |
| GOL6 | -15.541 | -2.46 | 0.004 | 25.446 |
| GOL1 | -14.9062 | -1.83 | 0.011 | 8.704 |
| GOL4 | -14.4329 | -1.35 | 0.025 | 3.911 |
| GOL5 | -13.9401 | -0.86 | 0.058 | 1.701 |
| GOL2 | -12.4136 | 0.66 | 0.775 | 0.128 |
| GOL13 | -12.0298 | 1.04 | 1.48 | 0.067 |
| GOL7 | -11.9119 | 1.16 | 1.810 | 0.055 |
| GOL12 | -9.7116 | 3.36 | 74.568 | 0.001 |

Conclusiones. GOL6, con una sustitución puntual en la α -hélice 3 mejora la afinidad por el ObR.

Agradecimiento. A productos Medix SA de CV, COFAA-IPN, BEIFI, CONAHCYT, a la SEPI de la ENMyH y, Proyectos SIP 20230876 y 20231114 del IPN.

Bibliografía.

- Haglund, E., Sułkowska, J. I., He, Z., Feng, G. S., Jennings, P. A., & Onuchic, J. N. (2012). The unique cysteine knot regulates the pleiotropic hormone leptin.
- Iserentant, H., Peelman, F., Defeau, D., Vandekerckhove, J., Zabeau, L., & Tavernier, J. (2005). *Journal of cell science*, 118(11), 2519-2527.
- Peelman, F., Zabeau, L., Moharana, K., Savvides, S. N., & Tavernier, J. (2014). *Journal of Endocrinology*, 223(1), T9-T23.
- Buß, O., Rudat, J., & Ochsenreither, K. (2018). *Computational and structural biotechnology journal*, 16, 25-33.

ESTUDIO TEÓRICO DEL MECANISMO DE REACCIÓN EIGEN-WILKINS DEL CISPLATINO DIHIDRATADO FISISORBIDO EN PROTOTIPOS DE GRAFENO

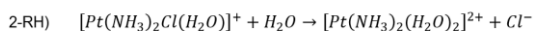
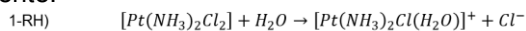
Verónica Ramírez Cid, Marco Antonio García Revilla, Jesús Adán Bazán Jiménez, Saúl Eduardo Noriega Medellín, José García Elías, Ma Del Refugio Cuevas Flores. Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Zacatecas, Zac. C.P. 98160.
vero.cid.rmz@gmail.com.

Palabras clave: Cisplatino, Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT), Mecanismo Eigen-Wilkins.

Introducción. El cáncer es un grave problema de salud en México y en todo el mundo. Uno de los fármacos anticancerígeno ampliamente utilizado es el cisplatino (CP), que actúa a través del mecanismo de reacción de Eigen-Wilkins, generando especies reactivas que se unen al ADN, lo que lo hace citotóxico, sin embargo, el cisplatino tiene efectos secundarios graves como toxicidad renal, hepática y cardíaca además puede llevar al desarrollo de resistencia (1). Los nanomateriales, como el grafeno y óxido de grafeno, tienen propiedades únicas a nivel molecular lo que permite su aplicación en la vectorización (2). En un estudio de química computacional, se demostró que el CP se adsorbe en los nanomateriales grafeno y el óxido de grafeno lo que sugiere que pueden ser buenos candidatos como nanotransportadores del fármaco (3). El objetivo principal de este estudio es evaluar por métodos computacionales las propiedades moleculares y termodinámicas del mecanismo de reacción Eigen-Wilkins de la hidrólisis del cisplatino dihidratado fisisorbido en prototipos de grafeno.

Metodología. Se construyeron tres modelos diferentes de grafeno de 32 átomos de C: C₃₂H₁₄ (aromático), C₃₂H₁₅OH (hidróxido) y C₃₂H₁₄O (epóxido), además del cisplatino prístino, monohidratado y dihidratado. La obtención de los puntos estacionarios, el estado de transición y la coordenada intrínseca de reacción se calcularon en la suite Gaussian 09 utilizando la DFT con el funcional B3LYP y conjuntos de base 6-311+G(2d,2p) para los átomos ligeros (C, O, N, Cl, H) y LANL2DZ para el átomo de platino.

Resultados. La reacción Eigen-Wilkins del CP es la siguiente:



Primeramente, se llevó a cabo la validación del nivel de teoría. Para ello se utilizó como modelo el CP sin adsorber los resultados de las propiedades termodinámicas (Tabla 1) y los parámetros geométricos las cuales se compararon con resultados reportados, obteniendo buena concordancia.

Tabla 1. Variación de entalpías de reacción (ΔH_r , kcal/mol) y energías libres de reacción (ΔG_r , kcal/mol) del cisplatino libre

| | ΔH_r | | ΔG_r | |
|--------------------|---------------------|---------------------|--------------|---------------------|
| | Fase gas | Fase acuosa | Fase gas | Fase acuosa |
| Primera Hidrólisis | 117.49* | 119.02* | 214.52* | 217.26* |
| | 123.26 ^a | 125.58 ^a | | 216.00 ^c |
| | 116.98 ^b | 119.30 ^b | | |
| | | 120.00 ^c | | |
| | | | | |
| | | | | |
| Segunda hidrólisis | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

*Calculada, DFT/B3LYP/6-311+G(2d,2p)& LANL2DZ, SMD (fase acuosa).
^aDFT/PBE-D3(BJ)/6-311+G&SSD, SMD (fase acuosa) (3).
^bDFT/B3LYP/6-31G**&LACVP, PB (fase acuosa) (4).
^cDFT B3LYP/6-31G(d,p)&LANL2DZ, PB (fase acuosa) (5).

La evaluación energética del CP fisisorbido en los soportes planteados se reportan en la tabla 2. Todos los ángulos de enlace y distancias de enlace son semejantes al del CP libre.

Tabla 2. Variación de entalpías de (ΔH_r , kcal/mol) y energías libres (ΔG_r , kcal/mol) del cisplatino fisisorbido en prototipos de grafeno en fase gaseosa.

| | CP | ΔH_r | ΔG_r |
|------------------------------------|------|--------------|--------------|
| C ₃₂ H ₁₄ | 2-RH | 186.13 | 189.43 |
| | 1-RH | 101.94 | 106.03 |
| C ₃₂ H ₁₄ O | 2-RH | 184.45 | 188.24 |
| | 1-RH | 99.54 | 104.51 |
| C ₃₂ H ₁₅ OH | 2-RH | 181.58 | 185.48 |

Conclusiones. Mediante los cálculos DFT se determinó entalpía y energía libre de reacción, así como los parámetros geométricos de CP fisisorbido en el soporte aromático, epóxido e hidróxido, para 1-RH y 2-RH. La reacción en fase gas es endotérmica y endergónica en todos los casos, lo cual es consistente con los datos reportados por lo que se pretende estudiar la reacción en medio acuoso y demostrar si se mantiene la actividad del fármaco.

Agradecimiento. Laboratorio de Química Cuántica, UACQ, UAZ. Laboratorio de Supercómputo Alto Rendimiento LNCPFEM, UG-UAA-CONACYT. Fundación UAZ-Newmont Peñasquito.

Bibliografía.

- Ito AM, Vemula SL, Gupta MT, Giram MV, Kumar SA, Ghosh B, Biswas S. (2022) *J Control Release*. 360:26-59.
- Torres Suárez AL. (2016) *Diagnostico*. 55(1): 33-7.
- Cuevas-Flores MR, Bartalomei M, García-Revilla MA, Coletti C. (2020) *Nanomaterials*.10(6).
- Graziani V, Coletti C, Marrone A, Re N. (2016) *J Phys Chem A*. 120(27):5175-86.
- Lau JKC, Deubel DV. (2006) *J Chem Theory Comput*. 2(1): 103-106.

El sitio activo de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* une a G6P como sustrato y como estabilizador estructural.

Edaena Benítez-Rangel y Roberto Velasco-García. Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UNAM). Tlalneptla, Estado de México, CP 54090. E-mail: robertvela2001@yahoo.com.mx.

Palabras clave: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; estabilidad estructural; piridoxal 5'-fosfato.

Introducción. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de la bacteria *P. aeruginosa* (PaG6PDH) participa en la vía de las pentosas fosfato produciendo NADPH y NADH. Entre sus características destaca el que une cooperativamente al sustrato G6P (1). También, a diferencia de otras G6PDHs que se fortalecen estructuralmente por la unión de NADP⁺, la PaG6PDH se estabiliza por G6P (2). Esta unión provoca un cambio conformacional en la enzima que la hace más tolerante a factores físicos y químicos inactivantes. En este trabajo investigamos si el sitio activo de PaG6PDH, que involucra a la Lys K179, es el mismo al que se une a G6P como sustrato y como estabilizador.

Metodología.

1. Se determinó el efecto del piridoxal 5'-fosfato (PLP) sobre la actividad y conformación de PaG6PDH. En estudios previos el PLP inactivó parcialmente a otras G6PDHs, modificando su Lys esencial (3). 2. Se investigó la estabilidad que confiere la G6P a las mutantes K179R y K179T de PaG6PDH, frente a la desnaturalización térmica y por urea. 3. Se estudiaron los efectos que sobre estas variantes tiene el PLP. Estas enzimas las obtuvimos y caracterizamos cinéticamente en un estudio previo.

Resultados.

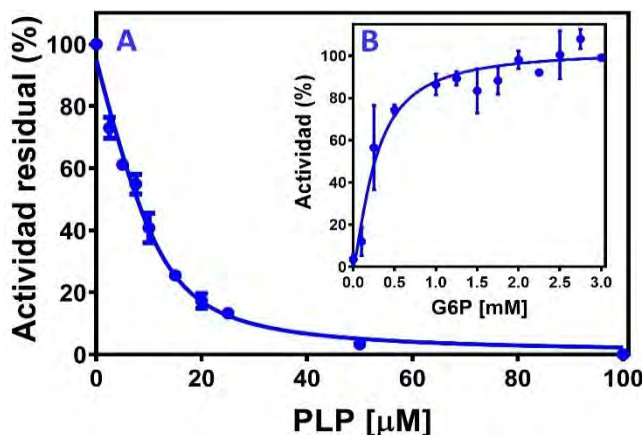


Fig. 1. La incubación con PLP (100 μM, 10 min a 22°C) inactiva totalmente, pero de manera reversible, a PaG6PDH (A). Concentraciones saturantes de G6P (3.0 mM), protegen totalmente a la enzima de la inactivación con PLP 100 μM (B). El amortiguador utilizado en éste y otros ensayos fue Hepes/tetrametil amonio 100 mM, pH 7.0.

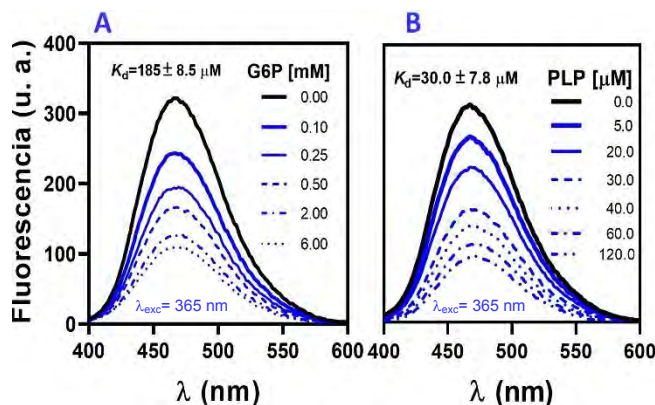


Fig. 1. El inactivador PLP (B) y el sustrato G6P (A) producen modificaciones conformacionales similares en PaG6PDH. Los cambios se determinaron midiendo la emisión del ANS que se une a las regiones hidrofóbicas parcialmente expuestas de PaG6PDH.

Aunque los resultados sugieren que se unen al mismo sitio en PaG6PDH, en donde se localiza K179, el PLP no confirió la estabilidad estructural que G6P proporciona a la enzima. Las mutantes K179T y K179R presentan características distintas a las de otras G6PDHs en las que la Lys esencial también fue modificada por Arg y Thr. La primera es inactiva, pero se estabiliza estructuralmente con concentraciones de G6P 50 veces superiores a la que estabiliza la Wt (144 mM). La segunda destaca por presentar cooperatividad negativa ($n_H=0.6$), y una afinidad por G6P 125 veces menor a la de la Wt ($K_m \approx 7.0$ mM). Como la primera, K179R solo fue estabilizada con altas concentraciones de G6P (44 mM).

Conclusiones. Los resultados sugieren que la unión del sustrato G6P al sitio activo de PaG6PDH cambia su conformación y la hace estructuralmente más estable.

Agradecimiento. Esta investigación se realizó con apoyo del PAPIIT al proyecto IN216923.

Bibliografía.

1. Acero-Navarro, K., Jiménez-Ramírez, M., Villalobos, M., Vargas-Martínez, R., Perales-Vela, H., Velasco-García, R. (2018). *Protein Expr Purif* 142: 53-61.
2. Benítez-Rangel E., Rodríguez-Hernández, A., Velasco-García R. (2020). *BBA-PaP* 1868 (2): 140331.
3. Camardella, L., Caruso, C., Rutigliano, B., Romano, M., Di Prisco, G., Descalzi-Cancedda, F. (1988). *Eur. J. Biochem.* 171: 485-489.

ESTUDIO DE LÁMINAS β DE POLIALANINA MEDIANTE CÁLCULOS DE ESTRUCTURA ELECTRÓNICA

Francisco Adasme-Carreño^{1,2}, Camila Muñoz-Gutiérrez¹, Joel Ireta³

¹Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Maule (CIEAM), Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, Universidad Católica del Maule, Talca 3480112, Chile.

²Laboratorio de Bioinformática y Química Computacional (LBQC), Departamento de Medicina Translacional, Facultad de Medicina, Universidad Católica del Maule, Talca 3480112, Chile.

³Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-534, Ciudad de México 09340, México

Email: fadasme@ucm.cl

Palabras clave: Estructura de proteínas, láminas β , estructura electrónica.

Introducción. Descifrar las fuerzas que impulsan a una secuencia de aminoácidos a adoptar la conformación nativa es crucial para entender el plegamiento de proteínas. La formación de hélices y láminas β está relacionada con mínimos de energía en el espacio conformacional de las proteínas. Previamente calculamos un mapa de energía de la cadena infinita de polialanina utilizando la teoría funcional de la densidad (DFT), que considera explícitamente la red de enlaces de hidrógeno y la cooperatividad, donde se observaron mínimos de energía bien definidos que están relacionados con las estructuras secundarias (1–3). Sin embargo, la lámina β aparece como una de las estructuras menos estables, posiblemente debido a la falta de los enlaces de hidrógeno entre aminoácidos lejanos en secuencia. En este trabajo, calculamos la energética de láminas β en modelos bidimensionales de polialanina para corregir este problema.

Metodología. Láminas β infinitas fueron simuladas utilizando un modelo periódico bidimensional, donde dos cadenas infinitas unidimensionales de polialanina están orientadas de forma paralela y/o antiparalela tal que formen enlaces de hidrógeno entre sí (4). Las estructuras fueron optimizadas usando DFT con el funcional PBE junto a ondas planas con un corte a la energía de 750 eV, pseudopotenciales bajo el método PAW, y la corrección de la dispersión Tkatchenko–Scheffler. Todos los cálculos se realizaron con los programas ASE [3] y VASP [4].

Resultados. En todos los casos, se encontraron estructuras que fueron capaces de establecer enlaces de hidrógeno entre cadenas, similar a las láminas β en proteínas. Los dímeros β (azul) mostraron una estabilidad por residuo de 3–5 kcal/mol mayor que la cadena de polialanina aislada (negro) como se muestra en la Fig. 1. La estabilización fue aún mayor para láminas β infinitas (rojo), con un mínimo de energía de casi -8

kcal/mol. El mínimo de energía de la hélice y fue menos profundo en los dímeros, y desapareció en las láminas β . No hubo diferencias significativas en la estabilidad de láminas β paralelas o antiparalelas.

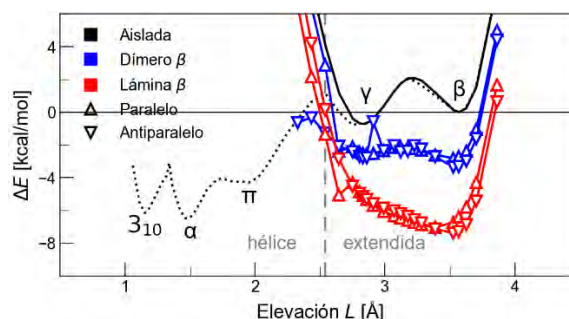


Fig. 1. Superficie de energía potencial de modelos bidimensionales de polialanina en función de la elevación L . Las líneas punteada y negra indican los caminos de menor energía del mapa de polialanina completo y estructuras extendidas, respectivamente.

Conclusiones. Recuperamos la estabilidad esperada de láminas β debido a los enlaces de hidrogeno entre cadenas. Interesantemente, logran ser más estables que las hélices α en los casos de sistemas infinitos. Esto puede tener injerencias interesantes en la formación de agregados amiloides.

Agradecimiento. F. A.-C. agradece financiamiento al proyecto ANID SIA 2021 SA772100091. J. I. agradece financiamiento al proyecto CONACYT A1-S-42775. Autores agradecen el tiempo de cómputo otorgado por LANCAD y CONACYT en el clúster Yoltla de la UAM-I.

Bibliografía.

1. Ireta J, Neugebauer J, Scheffler M, Rojo A, Galván M. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* 127 (49): 17241–17244.
2. Ireta J, Scheffler M. (2009) *J. Chem. Phys.* 131: 085104.
3. Adasme-Carreño F, Caballero J, Ireta J. (2021) *J. Chem. Inf. Model.* 61 (4): 1789–1800.
4. Rossmesl J, Kristensen I, Gregersen M, y cols. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125 (52): 16383–16386.

EFFECTO DE LA MODIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE AMARANTO EN LA SOLUBILIDAD Y EN LA ACTIVIDAD EMULSIFICANTE

Isai Jese Flores Lima, Jaqueline Meneses Pérez, Silvia Luna Suárez, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada - IPN, Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, México C.P. 90700
rei.2224@gmail.com, sluna@ipn.mx

Palabras clave: *Amarantina, propiedades tecno-funcionales, proteínas modificadas*

Introducción. La amarantina o globulina 11S (G11S) es una proteína de reserva (56 kDa), en las semillas de amaranto consta de dos sub unidades, ácida (34 kDa) y básica (22 kDa), con un buen balance de aminoácidos esenciales, y se ha propuesto como un buen candidato para posibles modificaciones ya que contiene 5 regiones variables (1). Por otro lado, las propiedades tecno-funcionales son de gran importancia en la industria alimentaria. Por lo que en este trabajo se hizo la modificación de la proteína globulina 11S en la región variable 3 con la inserción del péptido antihipertensivo VY, de la proteína completa (AmR3) y sólo de la subunidad ácida (AcR3); se compararon las propiedades de solubilidad y capacidad emulsificante de estas proteínas modificadas con la nativa recombinante expresada en *E. coli* y la proteína nativa extraída de la semilla.

Metodología. Las fuentes biológicas fueron *A. hypochondriacus* de donde se obtuvo amarantina nativa y *E. Coli* BL21 para amarantina recombinante (AmR3) y la sub unidad ácida (AcR3) ambas con la inserción del péptido VY en la región III.



Fig. 1 Diagrama de Flujo general

Resultados. La extracción y purificación de amarantina nativa fue de 10.3 mg/mL siendo mayor a lo reportado (2). Para las proteínas

recombinantes AcR3 y AmR3 se alcanzaron concentraciones de 1.5 mg/mL y 1.14 mg/mL respectivamente. En cuanto a la solubilidad se encontró que la amarantina nativa fue la más soluble, siendo más soluble 3 veces que la ovoalbúmina y caseína comerciales, y 4.6 veces mayor que la misma proteína obtenida recombinantemente (fig. 1). En cuanto a la actividad emulsificante, se observó que la amarantina nativa tiene mejor actividad que la caseína comercial, y que la AcR3 tiene mejor actividad que la AmR3.

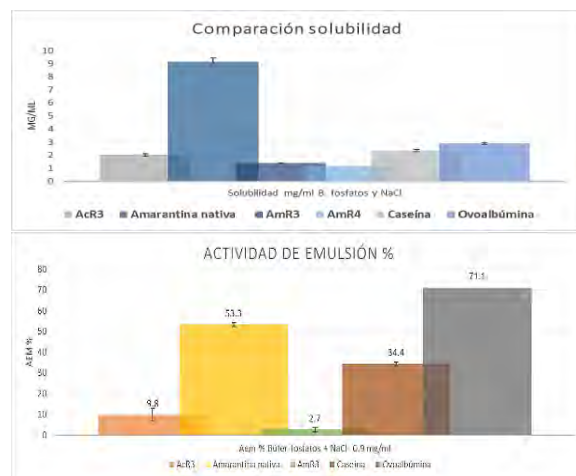


Fig. 1. Propiedades tecno-funcionales en medio salino

Conclusiones. Las modificaciones ejercen cambios en las propiedades funcionales en las proteínas recombinantes. La amarantina nativa puede ser empleada en sistemas alimenticios ya que posee propiedades emulsificantes aceptables.

Agradecimientos. Al CONACYT por el apoyo de la beca durante el posgrado.

Bibliografía. (1) Morales-Camacho, Paredes O., Espinoza E., Fernandez D.A., Luna S. (2016) *Elec. Jour. Biotech.* Vol. 22: 44-51.

(2) Barba de la Rosa A.P, Herrera A., Utsuni S., O. Paredes. (1996) *Jour. Plant Phy.* Vol: 149 527-532.

RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA PA2125 DE *Pseudomonas aeruginosa* CEPA PAO1

Arline Fernández Silva¹, Héctor Riveros Rosas², Rosario A. Muñoz Clares¹

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad de México CP 04510, México
fernandezarline@gmail.com

Palabras clave: Aldehído deshidrogenasas, relación estructura-función, estructura tridimensional

Introducción. Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) catalizan la oxidación irreversible dependiente de NAD(P)⁺ de una gran variedad de aldehídos a sus ácidos correspondientes. *Pseudomonas aeruginosa*, un importante patógeno oportunista de humanos, cuenta con 23 genes que codifican para ALDHs de 17 diferentes familias (1), muchas de las cuales no han sido aún estudiadas. Tal es el caso de la ALDH codificada por el gen PA2125, de la que hasta el momento no se ha reportado su caracterización estructural ni cinética, ni tampoco las de ninguna de las otras enzimas de la familia ALDH33, todas ellas bacterianas, a la que PA2125 pertenece. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio indicaron que PA2125 oxida aldehídos aromáticos (2) y recientemente hemos encontrado que de estos, los mejores sustratos son los derivados hidroxilados del benzaldehído, en particular el 2,5 hidroxibenzaldehído cuya oxidación la PA2125 cataliza muy eficientemente (3). Puesto que estos aldehídos son intermediarios en rutas de degradación de compuestos aromáticos identificados como contaminantes ambientales, pensamos que esta enzima podría usarse en procesos de biorremediación, y de aquí el interés del estudio de sus relaciones estructura-función.

Objetivo. Identificar residuos del sitio activo de la PA2125 que pueden ser importantes para la unión catalíticamente productiva de sus posibles sustratos y, mediante simulaciones de acoplamiento molecular, explicar las diferencias cinéticas encontradas entre estos sustratos.

Metodología. Se obtuvo el modelo de la estructura tridimensional de la enzima PA2125 predicho por AlphaFold 2, el que se usó para los acoplamientos moleculares con los mejores sustratos *in vitro*. Se realizaron alineamientos, tanto de secuencias como estructurales con otras ALDHs de las que se conoce su estructura tridimensional, empleando los programas muscle, ChimeraX y PyMOL.

Resultados. Las comparaciones de secuencias y estructurales mostraron que PA2125 posee en su sitio activo residuos no catalíticos—pero que en otras

ALDHs juegan papeles importantes en la especificidad por el sustrato aldehído—diferentes a los de la mayoría de las otras ALDHs de *P. aeruginosa*. En particular, PA2125 no tiene ninguno de los residuos aromáticos que forman lo que se conoce como “caja de aromáticos” y que están presentes en muchas ALDHs y participan en el reconocimiento del sustrato (4). En su lugar, hay residuos polares sin carga (Ser) o con carga (Arg, Lys y Glu). Interesantemente, estos residuos están muy conservados en otras 65 enzimas que identificamos como integrantes de la familia ALDH33. Los acoplamientos moleculares de los sustratos sugieren que estos residuos polares interactúan con los grupos hidroxilo de los derivados hidroxilados del benzaldehído, explicando así la especificidad de la enzima por estos aldehídos. La obtención y caracterización cinética de enzimas variantes en las que estos residuos se hayan cambiado por alaninas y/o residuos aromáticos—ya en curso—nos permitirá confirmar su papel tanto en la unión como en la catálisis.

Conclusiones. 1) Las características estructurales particulares del sitio activo de la PA2125 determinan su especificidad estricta por aldehídos derivados del benceno con sustituyentes hidroxilo. 2) En particular, los residuos Ser150, Arg157 y Glu449 parecen interactuar con estos posibles sustratos, permitiendo su unión productiva y una catálisis eficiente.

Agradecimientos. Trabajo financiado por DGAPA, UNAM (proyectos PAPIIT IN203423 e IN219022, otorgados a RAMC y HRR, respectivamente). AFS agradece la beca posdoctoral otorgada por la DGAPA, UNAM.

Bibliografía.

1. Riveros-Rosas, H, Julián-Sánchez, A, Moreno-Hagelsieb, G, Muñoz-Clares, R.A (2019). *Chem.-Biol. Interact.* 304: 83-87
2. Rueda-Sanabria, C.A (2017) *Tesis de maestría en Ciencias Químicas*. <https://tesisunam.dgb.unam.mx/>
3. Pirabal Valero G.A, Muñoz Clares, R.A. Resultados no publicados
4. Riveros-Rosas H, González-Segura L, Julián-Sánchez A, Díaz-Sánchez A.G, Muñoz-Clares R.A. (2013) *Chem.-Biol. Interact.* 202: 51-61.

BÚSQUEDA DE INHIBIDORES DE LA AMILOIDOSIS DE CADENA LIGERA POR MEDIO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

José Armando Santana Mendoza, Carlos Amero Tello. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Centro de Investigaciones Químicas, Cuernavaca Morelos, México. CP. 62209. Jose.santana@uaem.edu.mx

Palabras clave: Amiloidosis de Cadena ligera, fibras amiloides, Docking

Introducción. La amiloidosis de cadena ligera (AL) es una enfermedad mortal que afecta el funcionamiento de órganos vitales como el corazón, riñones, hígado y el sistema nervioso. El daño es causado por la agregación de fibras amiloides que ocasionan el fallo de los órganos (1). Estas fibras se originan por el mal plegamiento de cadenas ligeras de inmunoglobulina, una de las líneas germinales que esta relacionada con la AL es la 6aJL2, causante de la acumulación de cadenas ligeras a nivel sistémico (2). Hasta el momento no existe un tratamiento preventivo para evitar la agregación de fibras amiloides. En un estudio utilizando Acoplamiento Molecular (Docking) y sustentado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se observó que la molécula de epigalato (EGCG) tenía un efecto inhibitor en la formación de fibras amiloides. Sin embargo, la energía de unión observada entre la proteína y el EGCG era muy baja (3). En este trabajo realizamos Dockings entre la proteína 6aJL2 y moléculas similares al EGCG buscando obtener mejores interacciones entre la proteína 6aJL2 y el EGCG.

Metodología. Se buscaron moléculas similares al EGCG por medio del servidor SwissSimilarity y se realizaron acoplamientos moleculares de cuerpo flexible utilizando Autodock Vina. El docking se realizó con el PDB de la 6aJL2 (entrada 2MKW) y las moléculas seleccionadas. Se escogieron moléculas con interacciones en la misma región donde se observó interacción entre la proteína con el EGCG, con un rango de score de -5.6 a -6.6.

Resultados. Los resultados del docking muestran 3 moléculas (etopósido, sesaminol y tenopósido) con buenos resultados en su score promedio (-6.1 Kcal/mol, -6.05 Kcal/mol y -6.33 Kcal/mol respectivamente) como en la zona de interacción ligando-proteína. El etopósido y el sesaminol mostraron mayor interacción en la zona de interés primaria (64% y 62%) a diferencia del tenopósido (50%). El EGCG mostro resultados óptimos en su score promedio (-6.2 Kcal/mol) con muy baja interacción en la zona de interés primaria (30%).

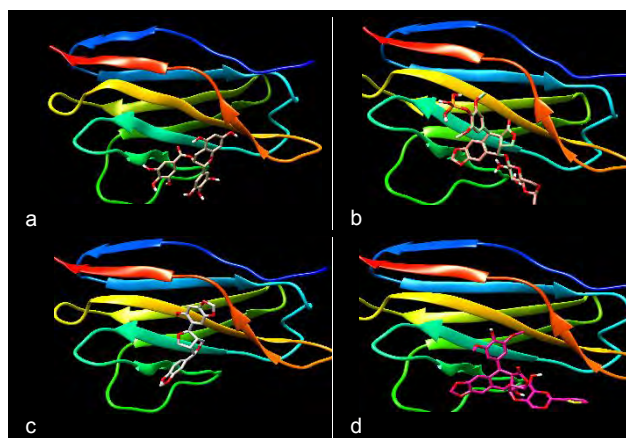


Fig. 1. Interacción de la proteína 6aJL2 con moléculas. A) Interacción entre el EGCG con la proteína. B) Interacción entre etopósido con la proteína C) Interacción entre el sesaminol con la proteína D) Interacción entre el tenopósido con la proteína.

Conclusiones. Moléculas similares al EGCG pueden tener un efector inhibitor en la formación de fibras amiloides; la investigación de interacciones ligando-proteína por medio de docking ayudan a la apertura de futuros ensayos *in vitro*.

Agradecimiento. Esta investigación fue financiada por el Laboratorio 213 de Resonancia Magnética Nuclear del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) UAEM.

Bibliografía.

1. Chango D., Fernandez R. (2022). *Arch Peru Cardiol Cir Cardiovasc* 3(4): 220-225
2. Lacouture J., Mejía L. (2022) *Amiloidosis AL: conceptos actuales*. Tapia L. Edimeco, Colombia: 119-139
3. Pelaez A. (2015). *Biochemistry*.18;54(32): 4978-86.

ESTUDIO ESPECTROSCOPICO DE LA INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA TAU CON COBRE Y ZINC

Gerardo Juárez¹, Luo Jinghui², Juan Gerez³, Liliana Quintanar Vera.⁴

¹Departamento de Química, Cinvestav, 2508 México, México. gerardo.juarez@cinvestav.mx

²Department of Biology and Chemistry, Paul Scherrer Institute, 5232 Villigen, Switzerland.

³Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zurich, 8093 Zurich, Switzerland.

Palabras clave: Proteína Tau, Metales, Alzheimer

Introducción. La proteína Tau se encuentra expresada en el SNC en neuronas y en células gliales. Se localiza principalmente en los axones, asociada a la alfa y beta tubulinas estabilizando la interacción, estructura y crecimiento de los microtúbulos. Existen seis diferentes isoformas de Tau: La isoforma más larga contiene 441 aminoácidos y se denomina Tau441. En la enfermedad de Alzheimer (EA) la Tau se encuentra hiperfosforilada y forma agregados que dan lugar a las marañas neurofibrilares (NFT por sus siglas en inglés), que es uno de los marcadores principales de la enfermedad junto a los depósitos de placas que contienen péptido β -amiloide ($A\beta$). Se sabe que el péptido $A\beta$ es capaz de coordinar diferentes metales como Cu, Zn y Fe.[1] Existen múltiples reportes en las últimas dos décadas acerca de la interacción del péptido $A\beta$ con metales, sin embargo, los estudios de unión de metales con la proteína Tau han sido escasos.[2]

Objetivo. En este trabajo se plantea estudiar la unión de cobre y zinc a la proteína Tau usando diversas herramientas de espectroscopía.

Metodología. Síntesis de Péptidos en fase sólida de diferentes secuencias de Tau y Expresión de las proteínas Tau441 y el fragmento K18. Titulaciones con Zn^{2+} , Cu^{2+} y Cu^+ seguidas por Resonancia paramagnética electrónica (EPR), Espectroscopía de dicroísmo circular (CD), Absorción de rayos X (XAS) y Resonancia Magnética Nuclear NMR[3].

Resultados.

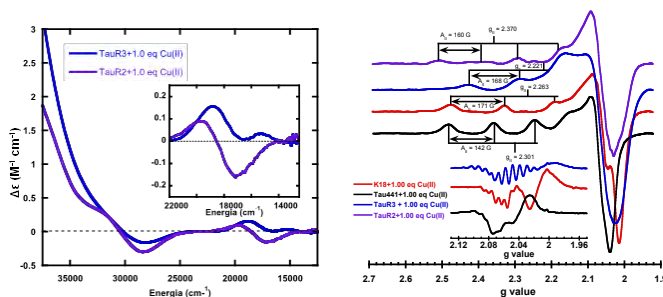


Fig. 1. Espectros de CD y EPR de Tau y fragmentos con Cu^{2+} .

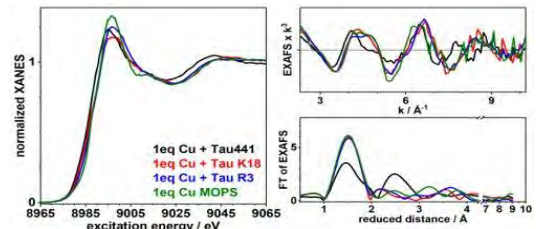


Fig. 2. Espectros de XAS (derecha XANES e izquierda EXAFS) de Tau y fragmentos con Cu^{2+} .

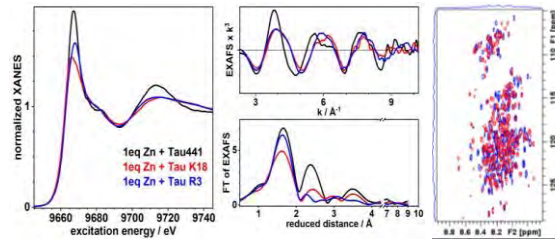


Fig. 3. Interacción de Tau y Zn^{2+} . Espectros de XANES y EXAFS (derecha y centro) y espectros de ^{15}N - 1H HSQC (izquierda) de Tau sin metal (azul) y con 1.5 eq de Zn^{2+} (rojo).

Conclusiones.

La proteína Tau puede coordinar Cu^{2+} , sin embargo, no solo la región de unión a microtúbulos estaría en vuelta en la coordinación. El Zn^{2+} se coordina a Tau y esta interacción con lleva un cambio en la estructura de la proteína.

Agradecimientos. A Cinvestav por los recursos otorgados para este trabajo. A Conacyt por la beca de doctorado 1078671. A la Universität St.Gallen (HSG) *Leading House for the Latin American Region* por la beca 2022 Consolidation Grant.

Bibliografía.[1] Y. Posadas, V.E. López-Guerrero, T. Arcos-López, R.I. Saylor, C. Sánchez-López, J. Segovia, C. Perez-Cruz, L. Quintanar. (2023) The role of d-block metal ions in neurodegenerative diseases. En: *Comprehensive Inorganic Chemistry III (Third Edition)*. J. Reedijk, K.R. Poepplmeier. Elsevier, Oxford, 575-628.

[2] A. Soragni, B. Zambelli, M.D. Mukrasch, J. Biernat, S. Jeganathan, C. Griesinger, S. Ciurli, E. Mandelkow, M. Zweckstetter. (2008) *Biochemistry*. 47: 10841-10851.

[3] L. Quintanar, L. Rivillas-Acevedo. (2013) *Methods Mol Biol*. 1008: 267-297.

Determinación de la correlación entre residuos de una proteína intrínsecamente desordenada

Luis Tito, Dayanne Pamo, David Ychocan, Miguel Vizcardo, Escuela de Física
Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú

Joel Ireta Universidad Autonoma Metropolitana - Iztapalapa, México

mvizcardoc@unsa.edu.pe

*Palabras clave: tres palabras escritas en letra Arial cursiva, tamaño 10, centrado Proteínas
Intrinsecamente desordenadas, Dinamica Molecular, PCA*

Introducción.

Determinar las relaciones de la dinámica entre regiones ordenadas y caóticas de proteínas intrínsecamente desordenadas juega un papel importante en la comprensión de cómo funcionan estas proteínas en el cuerpo humano.

La pregunta a responder en este estudio es si la dinámica estructural de una región intrínsecamente desordenada se correlaciona con la dinámica de una zona ordenada de este tipo de proteína. Al final de la introducción, en un párrafo aparte, deberá definirse el objetivo del trabajo.

Metodología.

Se simuló de la proteína 6ES5 con el software GROMACS usando diferentes campos de fuerza, al iniciar la dinámica se definieron los siguientes parámetros, se encerró a la proteína en una caja dodecaédrica con un vértice de 2 nanómetros, se llenó la caja con agua y posteriormente con iones que nos ayudan a equilibrar las cargas en el contenedor. Al concluir los pasos de la dinámica molecular se obtiene un archivo "protein-md.pdb" en donde tenemos los datos de la evolución temporal de las posiciones de la estructura tridimensional de los componentes de los residuos de la proteína en estudio, que sería la dinámica molecular en sí de la proteína.

La trayectoria obtenida se analizó usando cuaterniones. La conformación de los residuos a lo largo del esqueleto proteico, se describió en términos de un ángulo y una distancia. El ángulo indica la rotación a lo largo de un eje local, y la distancia (o elevación), una traslación



Fig 1 Proteína 6ES5

a lo largo del mismo eje. Se han desarrollado metodologías basadas en componentes principales para identificar correlaciones cinéticas entre diferentes secciones de la estructura de proteínas intrínsecamente desordenadas. Además, de determinar la predictibilidad en el tiempo del cambio en los cuaterniones para la proteína investigada.

Se utilizó PCA y Método Error de Predicción

Resultados.

Nos muestra el grado de confiabilidad al decir que la proteína es predecible

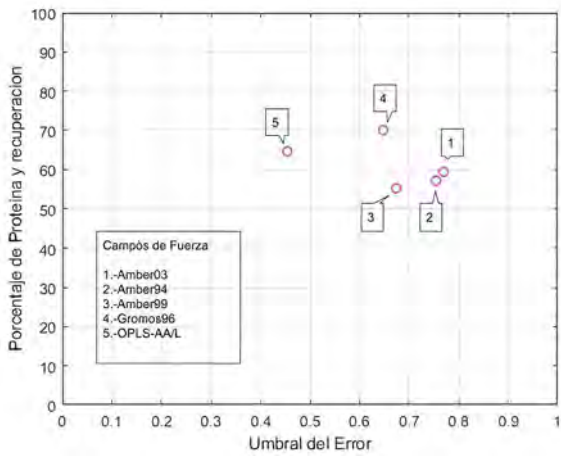


Fig 2 Confiabilidad de Predicción Proteína 6ES5-CID

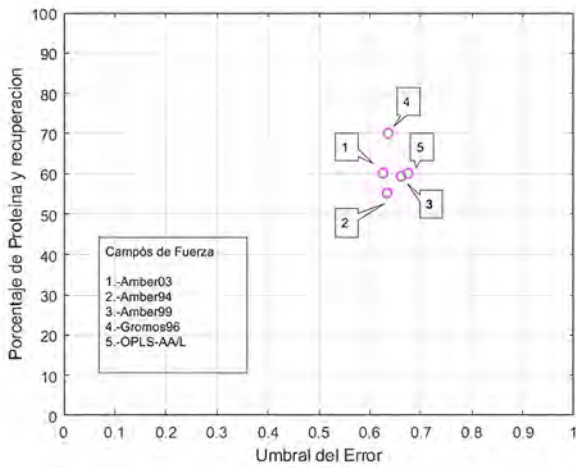


Fig 3 Confiabilidad de Predicción Proteína 6ES5-Union a CREB

Conclusiones.

La proteína 6ES5 tiene un grado de orden en su movimiento, por lo cual se puede determinar su movimiento con cierto grado de error.

La determinación de la correlación en el tiempo por el método implementado, nos ha mostrado que es posible determinar el porcentaje de la estructura de la proteína que está correlacionada.

El umbral de error de predicción se establece en 0.5 para la mejor obtención de correlación.

Las proteínas intrínsecamente desordenadas tienen funcionalidad en cierto porcentaje de su estructura.

Agradecimiento.

A la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Contrato IBA-IB-19-2020-UNSA

Bibliografía.

Yi Yang, Heng Tao Shen, Zhigang Ma, Zi Huang, and Xiaofang Zhou, L21-norm regularized discriminative feature selection for unsupervised learning, International Joint Conference on Artificial Intelligence, 1589-1594, 2011}

Zechao Li, Yi Yang, Jing Liu, Xiaofang Zhou, and Hanqing Lu, Unsupervised feature selection using nonnegative spectral analysis, AAAI Conference on Artificial Intelligence, 1026-1032, 2012

ESTRUCTURA Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CLP DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* Y EL SEGUNDO MENSAJERO C-DI-GMP

José Iván Soria Rodríguez¹, Miriam Livier Llamas García¹ y Samuel Lara González¹

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., División de Biología Molecular, San Luis Potosí, 78216, E-mail: samuel.lara@ipicyt.edu.mx

Palabras clave: Xanthomonas, Clp, CRP/FNR

Introducción. Clp es un factor de transcripción encontrado en bacterias del género *Xanthomonas*, que incluye diversas especies fitopatógenas con un impacto importante en el sector agrícola (1). Tiene un papel como regulador global de procesos celulares como la transición entre estados planctónico-sésil, la formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia (2). Clp pertenece a la superfamilia de proteínas con unión a DNA CRP/FNR. A diferencia de CAP, el integrante más estudiado de la superfamilia, Clp puede unirse al DNA de forma activa. En cambio, la unión a su efector específico, c-di-GMP, inhibe alostéricamente esta capacidad (3). Mediante la expresión heteróloga y purificación de Clp, se pretende realizar el análisis estructural y funcional de su estado activo y en interacción con c-di-GMP, utilizando cristalografía de rayos X.

Metodología. Se transformaron células BL21 Star (DE3) con el plásmido pET28_PPS/6XHis-Tag/Clp, para su crecimiento en 25 mL de medio LB adicionado con kanamicina [50 µg/mL]. Este preinóculo fue utilizado para la inoculación de 0.5 L de medio LB adicionado con kanamicina. La expresión de Clp fue inducida por IPTG 0.4 mM, incubando por 16 h a 28°C. Se procesaron 0.5 L de cultivo mediante sonificado a una amplitud de 50%, durante 7:30 min, en pulsos ON/OFF de 15 y 30 s, para la transferencia de su fracción soluble a una columna de agarosa Ni-NTA de Qiagen. Se utilizó una columna Sephadex g-25 PD10 para la desalinización de Clp, así como una columna HiTrap Heparin HP para su purificación. Finalmente, las fracciones en las que Clp eluyó fueron concentradas con el concentrador Sartorius Vivaspin™ Turbo 15.

Resultados. Se logró la expresión heteróloga de Clp, así como su purificación en un gradiente de imidazol. Posterior a su desalinización y purificación por cromatografía de afinidad a heparina, Clp fue concentrada hasta alcanzar una concentración de 3.2 mg/mL.

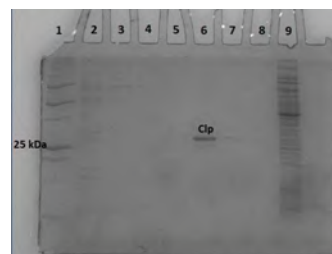


Fig. 1. Purificación por afinidad a níquel. Carril 1: Marcador. Carriles 2-5: Fracciones eluidas con imidazol 50 mM. Carriles 6-8: Fracciones eluidas con imidazol 500 mM. Carril 9: Frente.

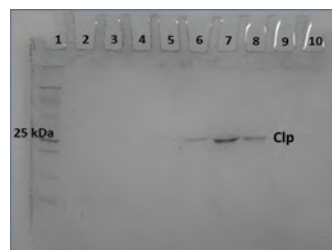


Fig. 2. Purificación por afinidad a heparina. Carril 1: Marcador. Carriles 2-10: Fracciones eluidas en el equipo AKTA-FPLC

Conclusiones. Clp puede expresarse con éxito en células BL21 Star (DE3) con una concentración de IPTG de 0.4 mM, y se ha logrado su purificación mediante cromatografías de afinidad a níquel y heparina. Sin embargo, al momento el rendimiento no ha resultado óptimo para proseguir con los ensayos de cristalización.

Agradecimiento. Al CONAHCYT (No. de apoyo 832218) y al IPICYT, A. C. Este trabajo fue financiado a través del proyecto de ciencia básica SEP-CONAHCYT No. CB2011-168710 a SLG.

Bibliografía.

1. Roberts, P. D., Berger, R. D., Jones, J. B., Chandler, C. K. & Stall, R. E. (1997) *Plant Disease* Vol. (81), pp. 917-921.
2. He, Y. W., Ng, A. Y., Xu, M., Lin, K., Wang, L.H., Dong, Y.H., Zhang, L. H. (2007) *Mol microbiol.* Vol (64), pp. 281-292.
3. Leduc, J. L. & Roberts, J. P. (2009) *J bacteriol.* Vol (191), pp. 7121-7122.

THE PLANT MITOCHONDRIAL HOMOLOGOUS RECOMBINATION

Josué Mora-Garduño, Antolín Peralta-Castro, Paola García-Medel, Corina Díaz-Quezada, Luis Briebe de Castro

Langebio, Cinvestav Irapuato, Irapuato, Gto., C. P. 36821, josue.mora@cinvestav.mx

Key words: Homologous recombination, mitochondrial DNA, double strand break repair

Introduction. Plant mitochondrial DNA (mtDNA) is exposed to a variety of physical and chemical agents that cause damage such as double-strand breaks. Repair of this type of damage is necessary to maintain the integrity of the mitochondrial genome, the function of mitochondria and cell viability. The homologous recombination (HR) pathway is the main double-strand break repair mechanism at plant mitochondria (1).

In *Arabidopsis thaliana*, a group of nuclear genes that code for proteins with mitochondrial localization signals have been identified, and their potential role in mitochondrial DNA repair via homologous recombination pathway has been proposed (1-3). However it has not been described a biochemical mechanism of homologous recombination. Understanding how homologous recombination occurs in the plant mitochondrial genome is important for understanding other phenomena characteristic of plant mitochondria, such as the low nucleotide substitution rate, as a replication pathway, the evolution of the mitochondrial genome, and the repair of double strand breaks.

Our aim is to describe a mechanism of homologous recombination in plant mitochondria.

Methods. The heterologous expression and purification of *A. thaliana* proteins was carried out, such as recombinases, an AtRecX regulatory protein, single-stranded DNA-binding proteins (SSBs), and a potential Holliday Junction mitochondrial resolvase AtYqgFi. *In vitro* biochemical assays for ATPase activity were carried out using thin layer chromatography, EMSA assays for DNA binding evaluation, as well as assays with the potential resolvase AtYqgFi for binding to DNA substrates and cutting assays.

Conclusions. The results obtained show that *Arabidopsis* mitochondrial recombinases bind to DNA of non-specific sequence, of different length and structure, and have DNA-dependent ATPase activity, which is inhibited by the AtRecX protein. On the other hand, the AtYqgFi protein binds preferentially to DNA substrates that emulate Holliday Junctions and cuts these substrates, demonstrating its potential role as a possible resolvase.

Results.

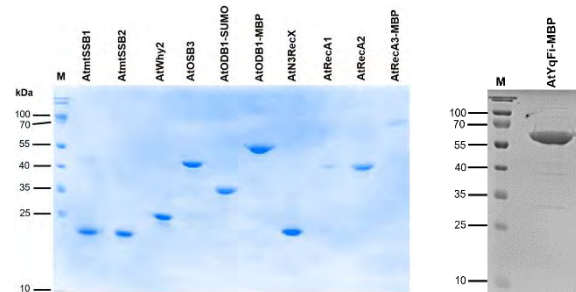


Fig. 1. SDS-PAGE electrophoresis of the purified proteins that make up the homologous recombination system in *Arabidopsis* mitochondria.

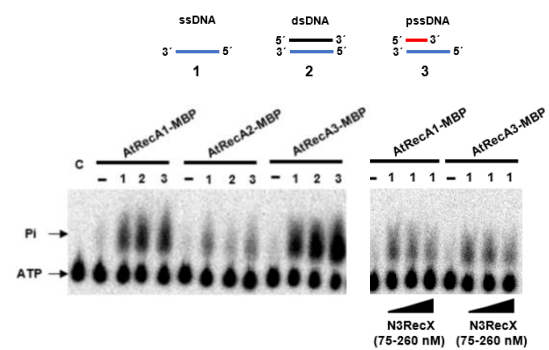


Fig. 2. Inhibition of ATPase activity of *Arabidopsis* mitochondrial recombinases.

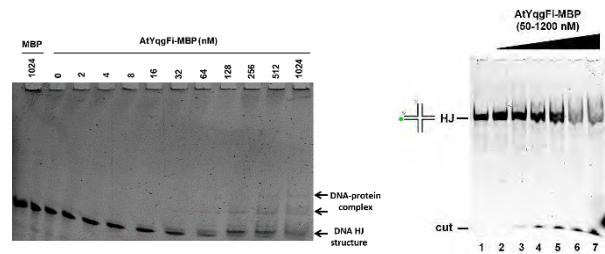


Fig. 3. AtYqgFi protein binds to DNA substrates that emulate Holliday Junctions (HJ) and cuts these substrates.

References

- Chevigny N, Schatz-Daas D, Lotfi F, Gualberto JM. (2020) *Int J Mol Sci.* 21(1): 328.
- Briebe LG. (2019) *Plants (Basel).* 8(12): 533.
- Shedge V, Arrieta-Montiel M, Christensen AC, Mackenzie SA. (2007) *Plant Cell.* 19(4):1251-1264.

Interrupción de la comunicación intramolecular por la mutación R1086Q en la GTPasa EFL1

Jonathan Alejandro Zúñiga-Domínguez¹, Abril Gijsbers¹, Rohit Jain², Erik R Farquhar³, Mark R. Chance², Nuria Sánchez-Puig¹

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, CDMX 04510, México. ² Centre for Synchrotron Biosciences, Case Western Reserve University, School of Medicine, 10900 Euclid Avenue, Cleveland, OH, 44106, USA. ³ Brookhaven National Laboratory, NSLS II, 11973-5000 Upton, NY, USA, nuriasp@unam.mx.

Palabras clave: Cambio conformacional, X-Ray Foot Printing, GTPasa EFL1.

Introducción. El síndrome de Shawachman-Diamond (SDS) es un trastorno causado por mutaciones en los genes *SBDS* y *EFL1* (Factor de Elongación tipo 1). Ambas proteínas se encargan de remover el Factor de anti-asociación eIF6 de las superficies de la subunidad ribosomal 60S. En este trabajo se estudió la mutación R1095Q (R1086Q en levadura) descritas en pacientes con SDS (1), la cual se encuentra dentro de dominio 4, se ha tratado de elucidar como esta mutación afecta a EFL1 y evita la remoción eficaz de eIF6. Se ha planteado la técnica de huella digital por rayos X para esclarecer los cambios conformacionales, la cual consiste en la evaluación de las zonas accesibles al solvente a través de los radicales $\cdot\text{OH}$ libres generados por la radiación.

Metodologías. Las proteínas EFL1 silvestre y mutante R1086Q se expresaron de acuerdo con lo descrito en (2). Las muestras fueron irradiadas por un haz de luz de rayos X en la línea 17-BM del National Synchrotron Light Source II (NSLS-II). Las muestras irradiadas se digirieron con proteasas y los péptidos resultantes se separaron por tamaño en un UHPLC acoplado a espectrometría de masas. Los espectros fueron validados con el programa *MassMatrix*TM y la fracción modificada y oxidada de cada ión se analizó con el programa *Xcalibur*TM. Se calculó la fracción normalizada no-modificada, la constante de velocidad de modificación y el factor de protección de cada péptido. El cociente de las constantes de velocidad se ubicó en un modelo por homología de la EFL1 de levadura.

Resultados. Se elaboró un histograma de la frecuencia en función del cociente de velocidades el cual describió una distribución normal que nos permitió discernir aquellos cocientes de velocidad que se encontraban una desviación estándar por arriba y por debajo de la media. Por tanto, se presentaban cambios significativos entre ambas condiciones comparadas. Se observó que la unión del nucleótido indujo cambios conformacionales a lo largo de toda la proteína y no

sólo cambios locales en la región de unión (Dominio G). En la proteína silvestre la unión de GTP resultó en la protección de los dominios G1-G5, mientras que en la mutante la unión del nucleótido provoca en gran medida la exposición de esta región. Más aún, el dominio IV donde se localiza la mutación, sufren rearrreglos opuestos, entre la proteína silvestre y la mutante al unirse al nucleótido.

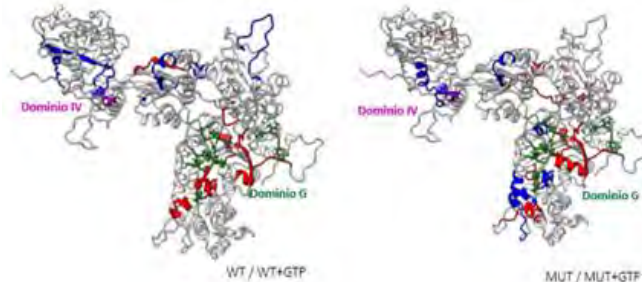


Fig. 1. Comparación de las regiones que cambian de conformación en EFL1 silvestre (WT) y mutante (MUT) al unir GTP. Azul - péptidos expuestos al solvente. Verde - subdominios G1-G5.

Conclusiones. La proteína silvestre y la mutante se encuentran en conformaciones distintas. Mientras, la unión a GTP en la mutante induce un cambio conformacional que no se asemeja al que adopta la proteína silvestre en su forma apo o unida al nucleótido.

Agradecimientos. PAPIIT IN215122. Beca de estudios de posgrado CONAHCYT.

Bibliografía.

- Stepensky P, Chacón-Flores M, Kim KH, Abuzaitoun O, Bautista-Santos A, Simanovsky N, Siliqi D, Altamura D, Méndez-Godoy A, Gijsbers A, Naser Eddin A, Dor T, Charrow J, Sánchez-Puig N, Elpeleg O. (2017) *J. Med. Genet.* vol. 54,8: 558-566
- Gijsbers A, Nishigaki T, Sánchez-Puig N. (2016) *JoVE*, vol 116.
- Pérez-Juárez J, Tapia-Vieyra JV, Gutiérrez-Magdalena G, Sánchez-Puig N. (2022) *Biomolecules* vol. 12,8 1141.

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE DESPLEGAMIENTO DE AppA1, LA PRINCIPAL FITASA DE *Escherichia coli*

Hurtado-Bautista, Enrique ¹; Segovia-Forcella, Lorenzo P. ², Velázquez-López, María Isabel ¹,
Fernández-Velasco, D. Alejandro ¹.

1. Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico City, Mexico. 2. Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico. Contact: e.hurtado.cinvestav.bt@gmail.com

Palabras clave: fitasa, purificación, evolución dirigida

Introducción. El ácido fítico y sus derivados actúan como reservorio de fósforo en plantas (1). Las fitasas son enzimas de la familia de las fosfatasa con alta actividad para hidrolizar ácido fítico y sus derivados. La mayoría de los animales que consumen plantas o piensos animales no son capaces de hidrolizar el ácido fítico, por lo tanto, las heces del ganado bovino, pollo y peces actúan como agente de contaminación cuando alcanzan zonas acuíferas generando eutroficación y reducción de oxígeno en ciertas zonas de la masa de agua (2). Más aún, el ácido fítico actúa como un antinutriente en alimentos humanos y animales debido a sus propiedades de quelación de metales en el tracto gastro-intestinal (3). Fitasas naturales han sido aisladas de plantas, hongos, animales y bacterias (4). Diversas fitasas están siendo actualmente utilizadas de manera industrial; aunque su uso es limitado debido a su relativamente baja termoestabilidad y actividad catalítica. La enzima Appa1 de *E. coli* ha sido blanco de esfuerzos de ingeniería para mejorar su estabilidad térmica; sin embargo, el mecanismo de desplegamiento de esta enzima ha sido escasamente estudiado.

Nuestro objetivo general es determinar las características termodinámicas y cinéticas del desplegamiento de Appa1 inducido por temperatura o agentes caotrópicos. Para ello, se llevarán a cabo experimentos de fluorescencia, dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido, los cuales requieren grandes cantidades de proteína pura. Por lo tanto, el primer paso consiste en sobreexpresar y purificar la proteína.

Metodología y resultados. La mayor expresión se obtuvo en *E. coli* BL21 Rosetta, a 30°C incubando por 3 horas después de la inducción con IPTG 0.6mM. El gen de Appa1, insertado en el plásmido pET24(b)+, contiene la secuencia señal para exportar la proteína al periplasma. La purificación se llevó a cabo a partir del método de Jia (1998) (2), que contiene un choque osmótico para extracción del contenido periplasmático.

Se identificó actividad catalítica de fitasa (utilizando el método de Shen (2005) (5) en las fracciones celulares del periplasma y el sobrenadante del lisado celular. Aunque se encontró mayor actividad en este último. Se continuó la purificación de la fracción periplásmica ya que contenía menos contaminantes. Las fracciones obtenidas tras purificación en intercambio aniónico (columna HiTrap Q HP) se evaluaron mediante gel de policacrilamida y por actividad catalítica. La actividad de fitasa se encuentra predominantemente en una fracción que tiene una pureza ~ 50 % y una actividad específica de fosfato liberado de 338 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Conclusiones. Hemos encontrado condiciones para la sobreexpresión y purificación parcial de Appa1, sin embargo, aún es necesario mejorar la purificación y aumentar el rendimiento.

Agradecimiento. Facultad de Medicina UNAM. Proyecto PAPIIT AV200322. E.H.B. es becario posdoctoral PAPIIT dentro del proyecto AV200322.

Bibliografía.

1. Greiner, R. T., Konietzny, U., & Jany, K. D. (1993). Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. Archives of biochemistry and biophysics, 303(1), 107-113.
2. Bae, H. D., Yanke, L. J., Cheng, K. J., & Selinger, L. B. (1999). A novel staining method for detecting phytase activity. Journal of microbiological methods, 39(1), 17-22.
3. Jia, Z., Golovan, S., Ye, Q., & Forsberg, C. W. (1998). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the *Escherichia coli* phytase. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 54(4), 647-649.
4. Mullaney, E. J., & Ullah, A. H. (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. Biochemical and biophysical research communications, 312(1), 179-184.
5. Shen, Y., Yin, Y., Chavez, E. R., & Fan, M. Z. (2005). Methodological aspects of measuring phytase activity and phytate phosphorus Journal of Agriculture and Food Chem., 53(4), 853-859.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MUTACIÓN S200G SOBRE LA ACTIVIDAD DE UNA CICLOGLUCANOTRANSFERASA TERMORRESISTENTE CON PH-MODULABLE

Laura Espinosa-Barrera¹, Beatriz Velazquez-Cruz^{1,3}, Sara Centeno-Leija^{1,2*}, Hugo Serrano-Posada^{1,2*}.

¹Laboratorio de Biología Sintética, Estructural y Molecular – LaBioSEM. ²Investigadores por México - CONAHCyT, LaBioSEM, Universidad de Colima, Colima, Colima, México, C.P. 28629. ³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Colima, Coquimatlán, Colima, México, C. P. 28400. *Autores de correspondencia: scenteno0@uocol.mx, hserrano0@uocol.mx

Palabras clave: CGTasas, especificidad pH-modulable, Ingeniería de proteínas

Introducción. Las cicloglucanotransferasas (CGTasas) son enzimas que escinden los enlaces α -1-4-glucosídicos del almidón para formar oligosacáridos lineales y ciclodextrinas (α -, β - y γ -CDs). En el sitio activo, comprendido por los dominios AB, se encuentran 9 subsitios (-7 al +2) involucrados en la catálisis. El mecanismo por el cual las CGTasas tienen la capacidad de ciclación está dada en los subsitios +2, -3 y -6 [1]. CldA es una CGTasa termorresistente de tres dominios ABC [2] con una alta competencia de desproporción/ciclación/hidrólisis pH-modulable. Su estructura cristalográfica (Fig. 1; [3]) mostró que en el subsitio -6 se genera un puente de hidrógeno de 2.6 Å entre Ser200 y el aminoácido central Phe216, ausente en CGTasas con alta especificidad de ciclación.

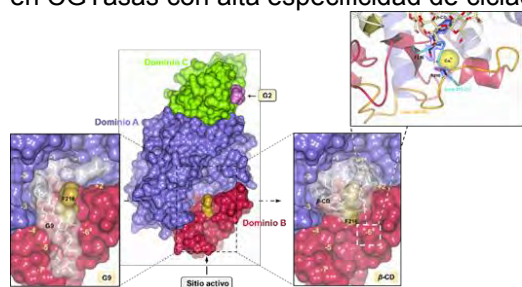


Fig. 1. Estructura cristalográfica de CldA (Código PDB 6WNI; [3]). Note a Ser200 interactuando con Phe216 en el subsitio -6 del sitio activo.

Metodología. Producción de CldA y CldA_{S200G} recombinantes: *E. coli* SHuffleT7::pET22b::CldA-S200G; medios: LB y YT2X; inducción: IPTG. Purificación: calentamiento térmico y cromatografía de afinidad a níquel. Actividad: método de DNS. Cuantificación de productos: HPLC. Las actividades de hidrólisis y ciclación se probaron en condiciones ácidas y neutras, en un intervalo de temperatura de 60-100 °C, con almidón soluble como sustrato.

Resultados. La caracterización de CldA_{S200G} en condiciones ácidas y neutras se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros bioquímicos de CldA_{S200G}

| pH | Estabilidad (t _{1/2} h) | Vmax (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹) | Km (mg mL ⁻¹) | C/H |
|-----|----------------------------------|---|---------------------------|-------|
| 5.0 | 2.6 | 334.8 ± 12.6 | 3.9 ± 0.7 | 0.018 |
| 7.0 | 55.4 | 220 ± 16.75 | 16.5 ± 3.33 | 0.13 |

CldA_{S200G} a pH 4.0 presentó una especificidad de desproporción/ciclación/hidrólisis de 41.59/0.49/57.92 comparada con 43.14/1.68/55.09 para la forma nativa (Fig. 2a). Para pH 7.0, CldA_{S200G} presentó una especificidad de desproporción/ciclación/hidrólisis de 50.62/2.11/47.29 comparada con 50.29/4.77/44.88 para la forma nativa (Fig. 2b). Estos resultados indicaron que CldA_{S200G} disminuyó 2.26 veces el rendimiento de CDs a pH 7.0, mientras que a pH 4.0 solo presentó productos de desproporción, 1.03 veces menor que CldA nativa. CldA_{S200G} conservó su propiedad termoestable y conservó el tipo de productos de desproporción G3-G7 e hidrólisis G1-G2.

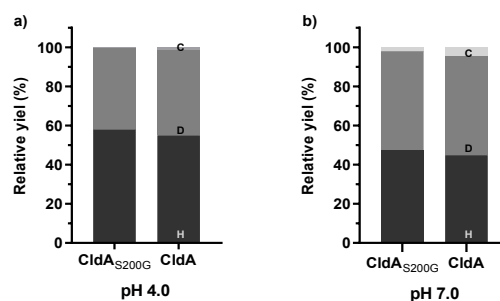


Fig. 2. Productos de ciclación (C), desproporción (D) e hidrólisis (H) sintetizados por CldA y CldA_{S200G} en condiciones ácidas (a) y neutras (b).

Conclusiones. La especificidad pH-modulable observada previamente en CldA, no recae en el residuo Ser200. Sin embargo, este residuo es clave para conservar la especificidad de ciclación en CldA. CldA_{S200G} resultó un biocatalizador termoestable atractivo para producir dextrinas lineales de alto valor agregado G3-G7 bajo condiciones ácidas.

Agradecimiento. LEB agradece al CONACyT por la beca posdoctoral No. 218862. SCL y HSP agradecen el apoyo de los proyectos CONACyT CB-2018-A1-S-18011, CF-2019-33-549477 e INFR-2021-17-316456.

Bibliografía. [1] Uitdehaag, J. C., et al., (1999). *J. Biol. Chem.* 274. [2] Centeno-Leija, S., Espinosa-Barrera, et al. (2022) *Scientific Reports.* 12:730. [3] Centeno-Leija, S., et al. (2023). *Escritura terminada.* Para JBC.

CARACTERIZACIÓN DE CadB1, UNA POSIBLE ENZIMA MUCONATO LACTONIZANTE, QUE PARTICIPA EN LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDO CLORANÍLICO EN *Herbaspirillum lusitanum* TQ07

Anahi Radilla Serrano, Yessica Monserrat Barba Guadarrama, Gabriela Eleonora Moeller Chávez, Rosa Angélica Guillén Garcés, Luis Gerardo Treviño Quintanilla, Universidad Politécnica del estado de Morelos, Ingeniería en Tecnología Ambiental, Jiutepec, C.P.62573, ltrevino@upemor.edu.mx.

Palabras clave: ácido cloranílico, biodegradación, enzima muconato lactonizante.

Introducción. Los compuestos aromáticos clorados son un grupo importante de contaminantes ambientales (1) con potencial teratogénico, mutagénico y carcinogénico (2). En la UPEMOR, se utiliza el ácido cloranílico (AC) como molécula modelo para dilucidar vías de degradación de compuestos aromáticos clorados. Previamente, se ha demostrado que *Herbaspirillum lusitanum* TQ07 es capaz de utilizar el AC como única fuente de carbono y energía (3). En esta cepa, se ha comprobado, mediante una mutante en el gen *cadB1*, que la proteína codificada por este gen participa en la degradación de AC, ya que la degradación de AC no se completa en esta mutante y en su lugar se acumula un metabolito de color amarillo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la posible función de la proteína CadB1 mediante un análisis bioinformático del gen *cadB1* y químico del metabolito.

Metodología.

Análisis bioinformático Predicción de estructura tridimensional por I-TASSER, RAPTOR-X y SWISS MODEL. Además, se utilizó InterPRO para estimar a que familia de proteínas pertenece CadB1.

Medios y condiciones de cultivo La cepa TQ07 wt y la mutante $\Delta cadB1$ se cultivarán en agar nutritivo con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina y 400 mg/L de AC a 30 °C. Una vez acumulado el metabolito se inocularon las células en medio mineral con AC y acetato como co-sustrato.

Extracción y purificación del metabolito Se realizará de acuerdo al protocolo del ácido 5-cloro-2-hidroximucónico semialdehído (4). Las etapas de la purificación se monitorearán con HPLC y CCF. Para analizar las características estructurales del metabolito se emplearon la prueba de Benedict y la liberación de ion cloruro por una prueba turbidimétrica.

Resultados. El análisis con Interpro de CadB1 arrojó una señal no integrada con la familia de las enzimas 3-carboxi-cis, cis-muconato lactonizantes que participan en vías de degradación de compuestos aromáticos, convirtiendo cis, cis- muconatos en muconolactonas. En bacterias esta enzima es un homotetrámero con un núcleo conservado de dos α -hélices. En el eucariota *Neurospora crassa* esta enzima presenta una

estructura de beta propela de 7 palas (5). Los tres programas de modelado utilizados predicen una estructura de beta propela de 7 palas para CadB1. En cuanto al análisis químico el metabolito acumulado presento una reacción de Benedict negativa y la liberación de ion cloruro en la mutante $\Delta cadB1$ es la mitad (64.5 mg) de la presentada en la degradación de AC por la cepa silvestre (128.9 mg).



Fig. 1. Predicción de la estructura tridimensional de la proteína CadB1 por I-TASSER, RAPTOR-X y SWISS MODEL.

Conclusiones. La proteína CadB1 presenta una estructura de beta propela de 7 palas con una actividad enzimática putativa de enzima 3-carboxi-cis, cis-muconato lactonizantes. El metabolito acumulado en la mutante *cadB1* no contiene grupos aldehído y presenta un átomo de cloro en su estructura.

Agradecimiento. Se agradece al CONAHCyT por las becas de posgrado otorgadas a Anahi Radilla Serrano y Yessica Monserrat Barba Guadarrama para realizar sus estudios de maestría.

Bibliografía.

- Zimmermann J, Halloran L, Hunkeler D. (2020). Chemosphere, 244: 125476.
- Cerniglia CE. (1984). Advances in applied microbiology, 30:31–71.
- Treviño-Quintanilla LG, Freyre-González JA, Guillén-Garcés RA, Olvera C. (2011). J Microbiol. 49(6):974-80.
- Wieser M, Eberspächer J, Vogler B, Lingens F. (1994). FEMS microbiology letters, 116(1):73–78.
- Kajander T, Merckel MC, Thompson A, Deacon AM, Mazur P, Kozarich JW, Goldman A. (2002). (London, England: 1993), 10(4):483–492.

ANÁLISIS *In silico* DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LePrx76 SOBRE DOS AUXINAS

Anabel Ruiz Flores, Aldo López Zamora, Josefina Vázquez Medrano, Cesar M. Flores Ortíz, Ignacio Peñalosa Castro. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Unidad de Biotecnología y Prototipos, Laboratorio de Fisiología, Estado de México, 54090, anabel.ruizbq@iztacala.unam.mx

Palabras clave: Auxinas, PrxCIII, catabolismo.

Introducción. Actualmente se siguen desarrollando técnicas de propagación de tomate, el uso de esquejes de tallos axilares aprovecha las células meristemáticas, Jankiewicz, 2003 (2). El crecimiento y desarrollo de las plantas está mediado por fitohormonas como las auxinas, siendo el Ácido Indol-3-Acético (AIA) importante en procesos fisiológicos que incluyen la formación de raíces adventicias, el alargamiento y división celular, la diferenciación de tejidos, el gravitropismo, el fototropismo y las respuestas defensivas, García, et al 2006 (1). Se sabe que las peroxidasas clase III son enzimas que desempeñan un papel en la lignificación, la resistencia a patógenos y metabolismo de las auxinas, Santner, 2009 (3)

En este trabajo, se evaluó *in silico* la afinidad de LePrx76 por los sustratos AIA y AIB para comprender la regulación homeostática y buscar inhibidores competitivos que permitan una función más prolongada de las auxinas, asegurando así el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Metodología. El docking molecular se realizó con dos programas, Autodock Vina y Autodock Tools bajo parámetros predeterminados, rotación libre de enlaces con libertad conformacional y residuos rígidos, se utilizó el algoritmo GA (Algoritmo genético) con 50 ejecuciones, tamaño de población de 150, con un tamaño de evaluación grande (25 millones). Una proporción de mutación genética de 0,02. Se realizó una comparación de la energía de unión y del índice de estabilidad para describir que auxina tiene una mayor estabilidad de acoplamiento. Se utilizó QSAR (conjunto de entrenamiento) para la validación.

Resultados

Acoplamiento. La proteína se unió a los ligandos, en residuos que coincide con la información encontrada en la base de datos InterPro, la cual menciona que el sitio de acción de la peroxidasa LePrx76 está desde el Aminoácido 'GLY 101 hasta el 'CYS 110.

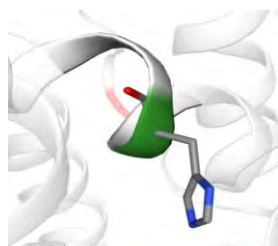


Fig. 1. AIA y AIB se unen al sitio activo de LePrx76, en los residuos R106, L107, H108, F109 y H110.

Catálisis enzimática. La proteína se unió a los ligandos auxínicos, teniendo una mayor afinidad de enlace con AIB respecto con AIA, en el proceso de catálisis se enlazan mediante puentes de hidrógeno a los átomos de oxígeno, de esta manera acelera la oxidación de estos compuestos, Passardi, 2005 (4).

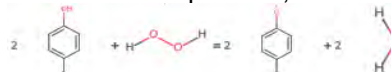


Fig. 2. Reacción donde la Prx cataliza la reacción por la cual el grupo peróxido en un fenol donante pasa a convertirse en agua.

Estabilidad. Realizando una comparación de la energía de unión (EU) y el índice de estabilidad (IE) se puede referir que la auxina AIB tiene una mayor estabilidad de acoplamiento que la AIA.

Tabla 1. Docking Molecular realizado con Autodock Vina, datos AU-IE de la interacción proteína ligando en el sitio activo.

| Complejo | LePrx76-AIA | LePrx76-AIB |
|---------------|-------------|-------------|
| EU (kcal/mol) | -7.3 | -7.8 |
| IE | 0.86019971 | 1.0 |

Conclusiones.

El ligando con mayor afinidad de unión es AIB, -7.8 kcal/mol de Energía de Unión y 1.0 de Índice de Estabilidad. Estos valores fueron contrastados con información obtenida por ensayo cinéticos *in vitro* donde hay una mayor actividad catalítica sobre el sustrato AIB, lo cual indica que al administrar AIB exógeno en esquejes de tomate el AIA endógeno puede ser utilizado por la planta en procesos como la formación de raíces adventicias, lo cual permitirá una mejor propagación vegetal.

Bibliografía.

- García R., Pérez L. (2006). Influencia de reguladores del crecimiento en la formación de callos de *Phaseolus vulgaris* L cv. CIAP 7247. *Biotecnología Vegetal*, 6(2).
- Jankiewicz, L. S. (2003). Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas, propiedades y acción. Ed. Mundiprensa, España.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidasas have more functions than a swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24: 255-265.
- Santner, A.; Calderon-Villalobos, L. I. A. y Estelle, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology*, vol. 5, no. 5, 2009, pp. 301-307, ISSN 1552-4450, 1552-4469.

Distribución filogenética y reconstrucción de fitasas ancestrales

Rogelio Iván Rosas López, Jorge Alejandro Pérez Niño y D. Alejandro Fernández Velasco
Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica,
Ciudad de México, 04360, rogelio.rosas@ciencias.unam.mx.

Palabras clave: fitasa, reconstrucción, fitato.

Introducción. El ciclo del fósforo involucra la circulación y transformación de este elemento en la biosfera. En las plantas el fósforo es almacenado en forma de fitato. Los animales monogástricos no somos capaces de hidrolizar al fitato, por lo que éste es desechado en las heces y liberado en los desechos acuíferos, donde ocasiona eutrofización. El fitato es además un antinutriente por su capacidad de quelar metales divalentes². Una alternativa para el aprovechamiento integral del fitato, es el uso de fitasas en los piensos animales, las cuales deben ser termoestables para resistir al procesado térmico de estos alimentos. La industria agropecuaria requiere por lo tanto fitasas con elevada actividad y termoestables, para ello se han caracterizado fitasas provenientes de diversos organismos. Las fitasas conocidas se agrupan en 4 categorías estructurales: fitasas púrpuras ácidas (PAPs), fosfotirosin fitasas (PTPs), fitasas de beta propela (BPPs) y fitasas ácidas de histidina (HAPs)⁴. Además de la diversidad natural, otra opción para generar fitasas termoestables son los métodos de ingeniería y diseño de proteínas, entre ellos se encuentra la reconstrucción ancestral de proteínas, una metodología que utiliza información filogenética para reconstruir secuencias ancestrales¹. A partir de este método ha sido posible recuperar funciones enzimáticas primordiales y obtener enzimas con mayor termoestabilidad². El objetivo de este trabajo es aplicar la reconstrucción de secuencias ancestrales para obtener una fitasa activa y termoestable.

Metodología. Utilizando secuencias modelo para los diversos tipos de fitasas se realizó una búsqueda en BLAST. Las secuencias obtenidas se depuraron para realizar un alineamiento múltiple para cada uno de cuatro tipos estructurales de fitasas.

Resultados. Se encontraron secuencias de HAPs y PTPs en los tres dominios de la vida, sólo se encontraron secuencias de BPPs en los firmicutes particularmente en el género *Bacillus*, y en algunos protistas fungoides. En el caso de las PAPs se encontraron secuencias en algas y en los principales grupos de plantas. Se encontró una alta variabilidad entre las BPP, incluso en organismos del mismo género. Este mismo patrón de variabilidad se presentó

en las PTPs siendo en extremo variables dentro de los firmicutes y con muy poca similitud al compararlos contra las plantas. Las secuencias de PAPs son principalmente de algas y con mayor presencia en las plantas que las HAPs, cuyas secuencias se encuentran en todos los dominios, aunque con mayor presencia en hongos y bacterias y en menor medida en las plantas. En las HAPs se encuentran la mayor cantidad de secuencias con segmentos conservados, aunque se presenta el mismo fenómeno de variabilidad entre grupos cercanos entre sí.

Conclusiones. Las fitasas son un grupo de enzimas que poseen una alta variabilidad entre si llegando a tener similitudes muy bajas incluso entre familias cercanas. Siendo las HAPs el grupo de fitasas con mayor presencia en la industria agropecuaria se concentrarán los esfuerzos en estas fitasas para encontrar los nodos de interés y realizar la reconstrucción de estas secuencias ancestrales.

Agradecimiento. Facultad de Medicina UNAM. Proyecto PAPIIT AV200322. Se agradece la ayuda técnica de la Dra. Isabel Velázquez López.

Bibliografía.

1. Hochberg, G., Thornton, J. (2017). Reconstructing Ancient Proteins to Understand the Causes of Structure and Function. *ARB*. Vol. 46: 247-269.
2. Thomson, R., Carrera, S., Gillam, E. (2022). Engineering functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction. *JBCR*. Vol. 298: 102435.
3. Kim, O., Kim, Y., Shim, J., Jung, Y., Jung, W., Choi, W., Lee, H., Lee, S., Kim, K., Auh, J., Kim, H., Kim, J., Oh, T., Oh, B. (2010) β -Propeller Phytase Hydrolyzes Insoluble Ca²⁺-Phytate Salts and Completely Abrogates the Ability of Phytate To Chelate Metal Ions. *B*. Vol. 49:10216-10227.
4. Lei, X., Weaver, J., Mullaney, E., Ullah, A., Azain, M. (2013) Phytase, a New Life for an "Old" Enzyme. *ARAB*.

STRUCTURAL ANALYSIS OF THE *ARABIDOPSIS THALIANA* ORGANELLAR REPLISOME

Dagio-Hernandez M. A., Peralta-Castro A., Diaz-Quezada C., González R., Brieba L.G.
Center for Research and Advanced Studies of the IPN (CINVESTAV), LANGEBIO, Irapuato, 36821,
mayra.dagio@cinvestav.mx

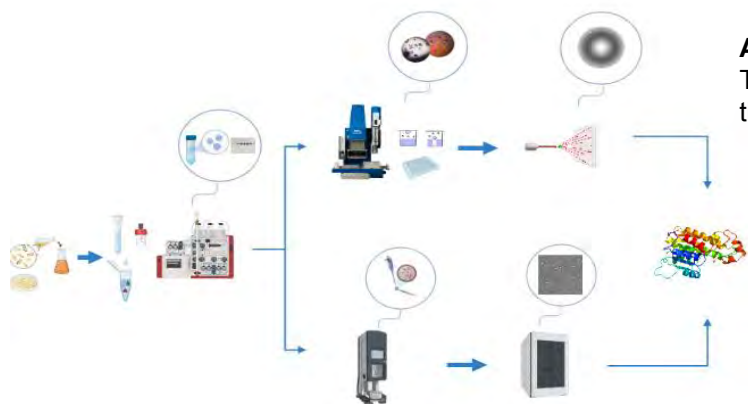
Key words: Replisome, Structural Biology, Cryo-EM

Summary

Mitochondrial and chloroplasts carry out important functions in plant cells such as ATP production, photosynthesis, and respiration. Their importance is such that they have their own genome which in most plants is very large. The integrity of these organelles is vital for the survival of plant cells. Both mitochondria and chloroplast use nuclear-encoded proteins to replicate their DNA but also in those organelles are codified some specific proteins required for vital functions. The replication mechanisms in plant organelles are still not clearly understood at present. The study of the structural organization of plant organellar replisome will contribute not only to the comprehension of this process but also will provide support to the endosymbiotic theory, since these enzymes have ancestral roots in the genes of bacteria and bacteriophages.

Main goal: to determine the structure of the plant organellar replisome, using *Arabidopsis thaliana* as model through X-Ray Crystallography and Cryo-EM.

Methods

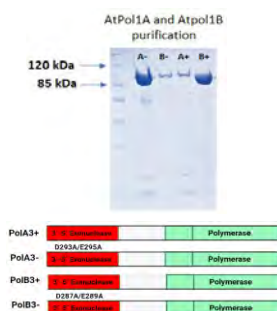
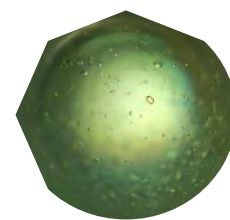
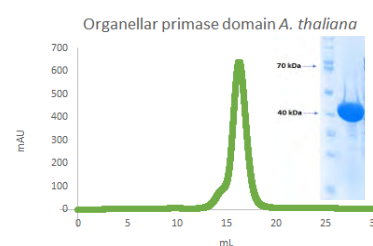
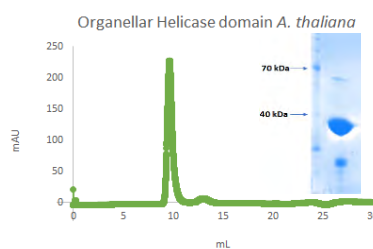


Bibliography:

- 1.- Diray-Arce, J., Liu, B., Cupp, J. D., Hunt, T., & Nielsen, B. L. (2013). The ArabidopsisAt1g30680 gene encodes a homologue to the phage T7 gp4 protein that has both DNA primase and DNA helicase activities. *BMC plant biology*, 13(1), 1-11.
- 2.- S. A., Peralta-Castro, A., Brieba, L. G., Miller, J., Ong, K. L., Ridge, P. G., ... & Nielsen, B. L. (2019). Arabidopsis thaliana organelles mimic the T7 phage DNA replisome with specific interactions between Twinkle protein and DNA polymerases Pol1A and Pol1B. *BMC plant biology*, 19(1), 1-16.
- 3.- Gao, Y., Cui, Y., Fox, T., Lin, S., Wang, H., de Val, N., ... & Yang, W. (2019). Structures and operating principles of the replisome. *Science*, 363(6429), eaav7003
- 4.- Gangwar, S. P., Green, M. N., Yelshanskaya, M. V., & Sobolevsky, A. I. (2021). Purification and cryo-EM structure determination of Arabidopsis thaliana GLR3. *STAR protocols*, 2(4), 100855.

Results

Purification and crystallization



Conclusion

The helicase and primase domains from AtTwinkle can be high quality purified. From the purified helicase domain can be obtained high quality crystals to be diffracted by X-ray Crystallography.

Acknowledge

To Conahacyt for the doctorate fellowship to carry out this project.

PLATAFORMA DE HUMANIZACIÓN, EXPRESIÓN Y RECUPERACIÓN DE LA AFINIDAD DE ANTICUERPOS IgE FUNCIONALES

¹Egard Rosas, ²Benjamín García, ¹Juan Carlos Muñoz, ¹Yamile Pelcastre, ¹Said Vázquez, ¹Sofía Rodríguez, ²Homero Gómez, ²Adela Rodríguez, ^{1,3}Martha Pedraza. ¹Unidad de Desarrollo en Investigación en Bioprocesos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, CDMX, C.P. 11340. ²Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria C.P.04510. ³CONAHCYT- UDIBI-ENCB-IPN, CDMC C.P. 11340 martha.pedraza@udibi.com.mx

Palabras clave: humanización, mutaciones reversas, IgE

Introducción. La humanización de anticuerpos es una técnica para disminuir la inmunogenicidad de aquellos con miras bioterapéuticas. 2F5 es una IgE monoclonal murina (2F5m) que reconoce a Hev b 8, una profilina de *Hevea brasiliensis*, con una afinidad de $1.7 \text{ Nm}^{-1,2}$. 2F5m fue humanizado mediante CDR grafting y expresado por co-transfección en células Expi293. Mediante simulación por dinámica molecular y análisis estructural se identificaron residuos que al cambiarse en la humanización comprometían la estabilidad e interacción con el antígeno. Algunos de ellos se reestablecieron mediante mutaciones reversas. La expresión y afinidad de estas mutantes se analizaron para identificar aquellas con mejores características biológicas comparadas con el anticuerpo murino de origen.

Metodología. La humanización del anticuerpo se realizó mediante CDR grafting. Las mutaciones reversas en los frameworks se introdujeron en las regiones variables VH y VL del anticuerpo 2F5h mediante PCR utilizando primers acarreadores de mutación. Los genes de las regiones variables fueron clonados en los vectores de expresión pFUSEss-CHlg-hG1 y pFUSEss-CHlg-hK, respectivamente. Ambas construcciones fueron co-transfectadas en células Expi293. Tras 4 días de expresión, los anticuerpos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía de afinidad. Se evaluó su reconocimiento por Hev b 8 mediante ELISA y finalmente su afinidad se determinó mediante SPR.

Resultados. La afinidad de 2F5h por Hev b 8 disminuyó una orden de magnitud comparada con su análogo murino. Con las mutaciones propuestas se buscar recuperar o incluso mejorar la afinidad de 2F5h.

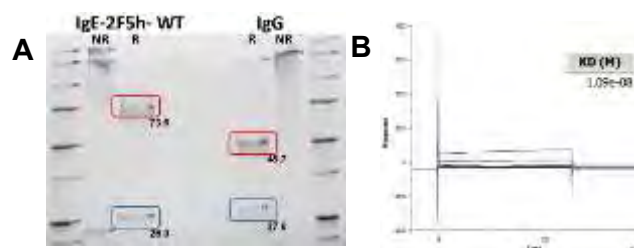


Fig. 1. En A se muestra un gel en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR) de 2F5h comparada con una IgG, en rojo se señalan las cadenas pesadas y en azul, las ligeras.

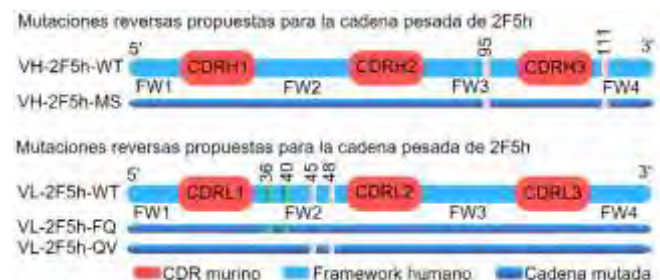


Fig. 2. Estrategia para realizar las mutaciones reversas dentro de los frameworks humanos de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo 2F5h.

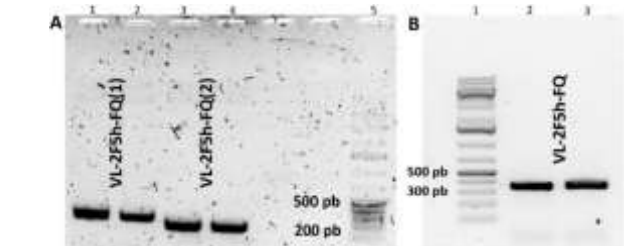


Fig. 3. Generación de la variante VL-2F5-FQ. La secuencia se amplificó por PCR en dos segmentos (A) que se traslaparon también por PCR (B).

Conclusiones. Se ha desarrollado una plataforma de humanización, expresión y recuperación de la afinidad capaz de generar anticuerpos recombinantes, humanizados y funcionales con características especiales como las de una IgE.

Agradecimiento. Este trabajo fue parcialmente financiado por el CONAHCYT a través de los proyectos CF 2019-87163 y 2021-312900. Las simulaciones por dinámica molecular se realizaron gracias a DGTIC-UNAM Supercómputo (Miztli) UNAM.

Bibliografía.

- Mares I., Martínez S., Garay C., Cano P., Torres A., Lara S., ... Rodríguez A. (2016). *Sci Rep*, 6, 32552.
- García B., Mares I., Rodríguez A., Cano P., Torres A., Ortega E. & Rodríguez A. (2022). *Communications Biology*, 5, 748.

Análisis estructural de la glutatión transferasa de 24 kDa de *Taenia solium*.

¹Ricardo Miranda-Blancas, ¹Roberto Flores-López, ¹Oscar Rodríguez-Lima, ²Ponciano García-Gutiérrez, ¹Lucía Jiménez, ²Rafael A. Zubillaga, ³Enrique Rudiño-Piñera y ¹Abrahan Landa

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, C. P. 04510, México.

²Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, C. P. 09340, México. ³Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, C. P. 62215, México.

ricardo.miranda@ibt.unam.mx

Palabras clave: Glutathion transferasa, Taenia solium, Estructura.

Introducción. Las glutatión transferasas se clasifican en tres grandes grupos: las GST citosólicas (cGST), mitocondriales y microsomales (1). En los cestodos sólo se han caracterizado microsomales y cGST. Su función principal es la desintoxicación de xenobióticos; sin embargo, participan en funciones como el catabolismo de aminoácidos aromáticos, la inmunomodulación y el transporte de moléculas. Por estos aspectos, son candidatos farmacológicos y vacunales (2). Las GSTs catalizan la conjugación del glutatión reducido (GSH) con una variedad de xenobióticos y son enzimas activas en su forma de dímero con subunidades de 20 a 30 kDa (3).

Metodología. Se amplificó el gen que codifica la Ts24GST para construir un vector de expresión utilizando el sistema pET22b para la expresión de la proteína en la cepa *E. coli* BL21 DE3. La proteína sobreexpresada se purificó por intercambio catiónico y exclusión molecular. La proteína pura fue utilizada para realizar ensayos cinéticos, dicroísmo circular y finalmente para montar pruebas de cristalización por la técnica de *microbatch*.

Resultados. Se realizó un análisis estructural del gen de la glutatión transferasa de 24 kDa de *Taenia solium* y su producto codificante (Ts24GST). El promotor proximal del gen reveló sitios de unión potenciales para factores de transcripción. El gen tiene un sitio de inicio de la transcripción, cuatro intrones divididos por tres intrones y un sitio de poliadenilación. La región codificante abarca 639 pares de bases que codifican un aminoácido de 212 con un peso molecular predictivo de 24.29 kDa. La proteína purificada muestra la forma activa de la Ts24GST recombinante (rTs24GST) existente como dímero. Los anti-rTs24GST muestra una reactividad cruzada sólo con las clases de GST humanas alfa y sigma. Además, el rTs24GST exhibió su máxima actividad a pH 9 y una temperatura de 45 °C. Finalmente, se determinó la estructura cristalográfica de la Ts24GST con una resolución de 1.9 Å.

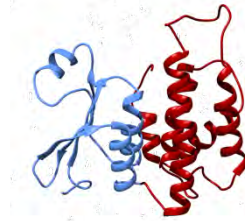


Fig. 1. Estructura cristalográfica de la Ts24GST de *T. solium* a 1.9 Å de resolución.

Conclusiones. Los análisis cinéticos muestran que la Ts24GST se mantiene estable en temperaturas entre 4 y 25 °C durante 24 horas. También, se observó que la estabilidad estructural se ve comprometida en temperaturas superiores a 45 °C. Finalmente, se determinó la estructura cristalográfica de la Ts24GST a 1.9 Å de resolución.

Agradecimiento. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-Frontier Science 2019-7397); Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPAPAPIIT-IN205422), La beca postdoctoral de Ricardo Miranda Blancas fue apoyada por el Programa de Becas Posdoctorales de la UNAM.

Bibliografía.

- Oakley, A. J. (2005). Glutathione transferases: New functions. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 15, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.10.005>
- García-Gutiérrez, P., Zubillaga, R. A., Téllez-Plancarte, A., Flores-López, R., Camarillo-Cadena, M., & Landa, A. (2020). Discovery of a new non-substrate inhibitor of the 26.5 kDa glutathione transferase from *Taenia solium* by virtual screening. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2020.107707>
- Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. In *Chemical Research in Toxicology* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.1021/tx960072x>

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS OSMOTINAS DE *Taxodium mucronatum*

Eric Edmundo Hernández Domínguez^{1,2}

¹Instituto de Ecología A.C., Red de Estudios Moleculares Avanzados, Xalapa, C.P.

² Investigador por México del CONAHCYT

eric.hernandez@inecol.mx

Palabras clave: Osmotinas, Thaxodium mucronatum, Adiponectina

Introducción. Las plantas cuentan con estrategias para defenderse del estrés tanto biótico como abiótico. Una de estas estrategias, es mediante la liberación de proteínas extracelulares como las osmotinas (Singh et al. 1987; Anu et al. 2015; Su et al. 2017; Le et al. 2018). Se reconoce que las osmotinas interactúan con algunas proteínas específicas de la membrana plasmática de los patógenos modificando su función (Kumar Srivastava et al. 2021). Además, la osmotina, es un homólogo de la adiponectina de mamíferos y se conoce que controla la apoptosis en levaduras interactuando con el receptor de la adiponectina (Narasimhan et al. 2005). La adiponectina regula el metabolismo energético del organismo, por lo que cualquier molécula (p. ej. la osmotina) que estimule su acción podría tener una potencial aplicación terapéutica en la obesidad y la diabetes tipo 2 (Palomer et al. 2005).

Por lo anterior es de gran interés estudiar con ayuda de la bioinformática las osmotinas de *Taxodium mucronatum* (Ahuehuete) y compararlas con la adiponectina humana.

Metodología. A partir de las secuencias parciales de las osmotinas obtenidas de un transcriptoma de árboles de Ahuehuetes (datos no publicados) se determinaron sus propiedades bioquímicas, % de identidad, composición de aminoácidos entre otros. También, se realizaron alineamientos con osmotinas de otros organismos y se construyeron filogenias. Finalmente se desarrollaron modelos tridimensionales y se compararon con la estructura de la adiponectina.

Resultados. Con los datos transcriptómicos se realizó la búsqueda y la identificación de las secuencias codificantes para las proteínas osmotinas de *Ahuehuete* (Fig. 1).

Estas se ordenaron y agruparon con base a sus propiedades, identidad, filogenia y se obtuvieron las estructuras 2D y 3D (Fig. 2).

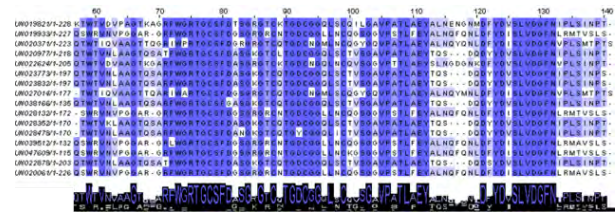


Fig. 1. Alineamiento parcial de las osmotinas de Ahuehuete. En el alineamiento se observa la región conservada y el consenso de aminoácidos.

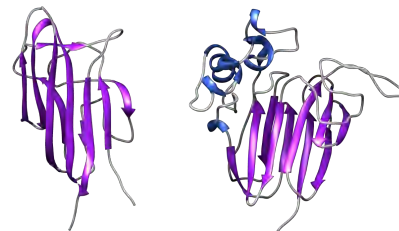


Fig. 2. Modelos tridimensionales de la osmotina de Ahuehuete (A) y de la adiponectina humana (B). La estructura tridimensional de la adiponectina se descargó del Protein Data Bank (6u66). En color violeta se muestran las láminas beta y en color azul las alfa hélices.

Conclusiones. Se identificaron secuencias parciales de las osmotinas de Ahuehuete, se predijeron sus propiedades, su probable localización subcelular y se construyeron modelos tridimensionales.

Bibliografía.

- Anu K, Jessymol KK, Chidambareswaren M, Gayathri GS, Manjula S. (2015). *Indian J Exp Biol.* 53(6):329–34.
- Kumar Srivastava D, Kumar Thakur A, Kumar P, editors. (2021). *Agricultural Biotechnology: Latest Research and Trends. Singapore: Springer Nature Singapore.*
- Le TTT, Williams B, Mundree SG. (2018). *Physiol Plant.* 162(1):13–34.
- Narasimhan ML, Coca MA, Jin J, Yamauchi T, Ito Y, Kadowaki T, Kim KK, Pardo JM, Damsz B, Hasegawa PM, et al. (2005). *Mol Cell.* 17(2):171–180.
- Palomer X, Pérez A, Blanco-Vaca F. (2005). *Med Clin (Barc).* 124(10):388–395.
- Singh NK, Bracker CA, Hasegawa PM, Handa AK, Buckel S, Hermodson MA, Pfankoch E, Regnier FE, Bressan RA. (1987). *Plant Physiol.* 85(2):529–536.
- Su H-Y, Chou H-H, Chow T-J, Lee T-M, Chang J-S, Huang W-L, Chen H-J. (2017). *Bioresour Technol.* 244:1294–1303.



VIII Congreso de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas

ANÁLISIS DE INTERACCIÓN EN LA ISOMERIZACIÓN DE PROLINAS: UN ENFOQUE BASADO EN TVCYP2 Y HASA

Gómez-Pérez Leonardo Sebastián¹, Otero-Pedraza Alejandro², Ortega-López Jaime², Antonio-Pérez Aurora¹
Departamento de Bioingeniería, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Instituto Tecnológico y de Estudios
Superiores de Monterrey, Campus Estado de México. Atizapán de Zaragoza, 52926.
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Ciudad de México, 07360.
A01373058@tec.mx

Palabras clave: Prolil isomerasa, replegamiento, docking.

Introducción. El proceso de plegamiento de proteínas es asistido por la presencia de chaperonas que catalizan cambios conformacionales en las proteínas. La ciclofilina TvCyP2 presenta actividad prolil isomerasa, la cual se ha propuesto como un método para asistir el plegamiento de proteínas cuya solubilidad se ve desfavorecida por conformeros específicos de las prolinas [1][2], produciendo un mal plegamiento y su posterior agregación, sin embargo; el mecanismo de isomerización aún no se ha elucidado completamente. Las proteínas intrínsecamente desordenadas con alto contenido de prolinas como la hialuronidasa (HASa) de *B. vagans* (22 prolinas), pueden servir como sustrato modelo para estudiar el mecanismo catalizado por TvCyP2. En este trabajo se analizaron los residuos e interacciones que participan en el acoplamiento entre TvCyP2 y HASa a través de docking molecular, con la finalidad de profundizar en el proceso de isomerización de TvCyP2.

Metodología. Los modelos pdb de TvCyP2 y HASa fueron obtenidos a través de una predicción de estructura tridimensional usando el servidor iTasser. Los modelos fueron validados (SAVES v6.0) y refinados (ModRefiner). Las simulaciones de *docking* molecular se llevaron a cabo en el servidor HADDOCK 2.4 usando los ajustes por defecto del sistema. Las interacciones de los archivos pdb de los modelos acoplados TvCyP2-HASa se analizaron usando el software LigPlot 2.2. Para estas simulaciones se usaron los residuos R66, I68, F71, M72, A112, F124, L133 que se han reportado previamente para la ciclofilina A de humano [3] y las prolinas 28, 192 y 274 por su locación estratégica en giros a lo largo de la superficie de la HASa.

Resultados. El análisis de interacciones muestra que la R66 de TvCyP2 es susceptible a formar enlaces de hidrógeno, mientras que los residuos F71, W132, K136, L133 y S160 forman constantes interacciones hidrofóbicas con distintos residuos de la enzima HASa dependiendo de la locación de la prolina en cuestión. Los residuos W132, K136 y S160 no han sido previamente reportados como parte del sitio de unión de la ciclofilina en su actividad prolil isomerasa [3]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que dichos

residuos son relevantes en la formación del ambiente hidrofóbico necesario para la isomerización de la prolina [4][5][1]. Asimismo, la S160 y la P69 presentaron las únicas interacciones con las prolinas evaluadas. Estas interacciones fueron del tipo hidrofóbico, las cuales concuerdan con observaciones previas. No obstante, no se encontraron puentes de hidrógeno que estabilizaran el grupo amino de la prolina como se ha descrito en la literatura [4].

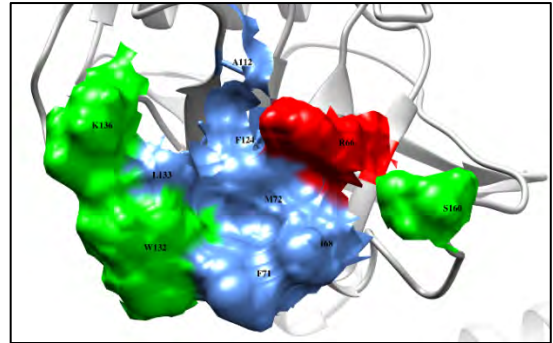


Fig. 1. Residuos involucrados en la interacción TvCyP2-HASa. En rojo se muestra la R55 que forma enlaces de hidrógeno, en azul los residuos que se usaron para la simulación y en verde los residuos que se encontraron tras las simulaciones y presentaron un mayor número de interacciones.

Conclusiones. Los aminoácidos K36, W132 y S160 no descritos previamente, forman parte del ambiente necesario para la interacción entre TvCyP2 y HASa. Además, se reprodujo el comportamiento de R66 en la formación de enlaces de hidrógeno. No se observa alguna interacción que estabilice el grupo amino de las prolinas estudiadas.

Agradecimiento. Se agradece al CONAHCYT por la beca de manutención.

Bibliografía.

- Schmidpeter, P., & Schmid, F. (2015). *Journal of Molecular Biology*. Vol (427): 1609-1631.
- Babu, M., Favretto, F., Rankovic, M., & Zweckstetter, M. (2022). *Journal of the American Chemical Society*. Vol (144): 16157-16163.
- Favretto, F., Jiménez-Faraco, E., Conter, C., Dominici, P., Hermoso, J., & Astegno, A. (2023) *ACS infectious diseases*. Vol (9): 365-377.
- Dunyak, B., & Gestwicki, J. (2016). *J. Med. Chem.* Vol (59): 9622-9644.
- Zhang, Y., Daum, S., Wildemann, D., Zhou, X., Verdecia, M., Bowman, M., Lücke, C., Hunter, T., Lu, K. P., Fischer, G., & Noel, J. (2016). *J. Med. Chem.* Vol (59): 9622-9644.

EL EFECTO DE MUTACIONES PUNTUALES SOBRE LA ESTABILIDAD Y EL ESTADO DE AGREGACIÓN DE LA PROTEÍNA CGI-58 DE HUMANO

Miriam L. Llamas-García¹, Edgar D. Páez-Pérez¹, Claudia G. Benítez-Cardoza², Gabriela Montero-Morán³, Samuel Lara-González^{1*}

samuel.lara@ipicyt.edu.mx

¹IPICYT, Camino a la Presa San José # 2055 Col. Lomas 4^a Sección San Luis Potosí, S.L.P.

²Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateo, Ciudad de México.

³Facultad de Ciencias Químicas, UASLP, Av. Manuel Nava #6, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P.

Palabras clave: Fosfomimetización, solubilidad, estabilidad térmica

Introducción.

La lipólisis es un proceso bioquímico dinámico que consiste en la degradación de triglicéridos neutros almacenados en gotitas de lípidos (LD) en respuesta a una alta demanda de energía. Este proceso está regulado por la señalización de catecolaminas, que modulan la función de las proteínas (Figura 1). En condiciones basales de lipólisis, la proteína periférica Perilipina 1 (PLIN1) se encuentra en la superficie de las gotitas de lípidos en un complejo con CGI-58, la proteína activadora de la enzima ATGL, que cataliza el primer paso de la lipólisis (1). En condiciones de estimulación, PKA activa la señalización de la fosforilación, lo que da como resultado la fosforilación de PLIN1 y CGI-58 (2). En consecuencia, la interacción CGI-58 y PLIN1 se interrumpe, lo que permite que CGI-58 reclute ATGL a la LD para iniciar la hidrólisis de triglicéridos. Además, CGI-58 no sólo aumenta la actividad de ATGL (20 veces en ratones) sino que también extiende su regiospecificidad a la posición sn-1 del TAG (3). Las interacciones de CGI-58 tanto con PLIN1 como con ATGL juegan un papel clave en la regulación de la lipólisis. Por este motivo, CGI-58 ha sido objeto de varias investigaciones. Sin embargo, esta proteína presenta problemas de estabilidad y solubilidad que dificultan el proceso de purificación.

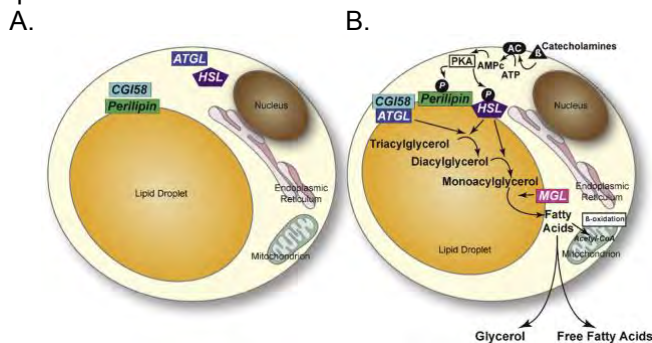


Fig. 1. Rol de las proteínas en la regulación de la lipólisis. A) Condiciones basales. B) Lipólisis estimulada por catecolaminas.

Metodología. Se realizó la clonación del gen que codifica para la proteína hCGI-58 WT, las mutantes 3WA y 3WA/S237 en el vector pET28 modificado. Se estandarizó la expresión de las proteínas recombinantes en *Escherichia coli* y su purificación por cromatografía de afinidad, intercambio iónico y exclusión molecular. Posteriormente se realizó la caracterización físicoquímica y funcional de las proteínas mediante análisis de estabilidad térmica, dispersión dinámica de luz, dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca y análisis de los modelos estructurales elaborados con I-TASSER (4).

Resultados.

De acuerdo con el análisis bioinformático en AGGRESCAN, los residuos de W19, W23, and W27 conforman un sitio de nucleación que promueve la agregación de la proteína CGI-58. Esto lo validamos por cromatografía de exclusión molecular y DLS con la triple mutante 3WA y cuádruple mutante 3WA/S237, que presentaron mayor proporción de la proteína monomérica en comparación con los agregados de alto peso molecular que observamos con la proteína WT. Mediante un ensayo de estabilidad térmica (Thermofluor), determinamos que la fosfomimetización de la mutante 3WA/S237 mejora la estabilidad térmica en ~2 °C. Nuestros resultados en los ensayos de unión a ligando, espectroscopia de CD en regiones UV-lejanas y -cercanas, sugieren que la mutante cuádruple (3WA/S237E) es funcional y mantiene su conformación nativa. El análisis de los modelos bioinformáticos nos sugiere la existencia de una interacción intramolecular entre la cadena lateral del ácido glutámico (237), localizado en la tapa que protege el posible sitio catalítico, con un residuo del dominio a/b hidrolasa resultando en una conformación más estable y compacta de CGI-58.

Conclusiones. Los triptófanos del N-terminal de CGI-58 de humano juegan un papel importante en el estado de oligomerización de la proteína, así como el aumento de estabilidad térmica y estructura secundaria en la fosfomimetización de la S237, generando una hipótesis en el papel de la fosforilación.

Agradecimiento. Este trabajo fue apoyado por CONAHCYT a través del proyecto subvención número CB-168710 e INFRA-204373 así como con la beca #395867

Bibliografía.

- Zierler KA, Zechner R y Haemmerle G. Current Opinion in Lipidology 2014;25(2):102-109
- Oberer M, Boeszoermenyi A, Nagy HM y Zechner R. Current Opinion in Lipidology 2011;22:149-158
- Eichmann TO, Kumari M, Haas JT, Farese RV, Zimmermann R, Lass A y Zechner R. The Journal of Biological Chemistry 2012;287(49):41446-41457
- Llamas-García, M.L.; Páez-Pérez, E.D.; Benítez-Cardoza, C.G.; Montero-Morán, G.M.; Lara-González, S. ACS Omega 2022, 7, 12643–12653

The role of the AT8 and AT100 isoforms of the phosphorylated TAU protein in the formation of neurofibrillary tangles and their participation in Alzheimer's disease.

Kiara-Gamez¹, Lilian E Araujo Arcos², José Luna Muñoz^{3,4} and Sarita Montaña¹. ¹Laboratorio de Bioinformática y Simulación Molecular, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. ²Laboratorio de Biomedicina, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. ³Biobanco Nacional de Demencias, Universidad Politécnica de Pachuca. ⁴Banco Nacional de cerebros UNPHU, Republica Dominicana. mmontano@uas.edu.mx.

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the deterioration of cognitive functions (reasoning, behavior, and language) and the gradual loss of short-term memory. These clinical symptoms have been associated to neuronal death due to the massive accumulation of paired helical filaments (PHF). The main constitutive protein of the PHF's is the TAU protein. The TAU protein in AD undergoes post-transductional modifications (hyperphosphorylation and truncation), which have been associated with the genesis of PHF's. The truncation of the TAU protein at Glu 391 and Asp 421 favor the polymerization of the protein and its insolubility. The phosphorylation mechanism of the TAU protein has been associated with a protection mechanisms of the minimum filament core (92-95 amino acids) and culminates in the truncation at Glu 391 which is highly toxic. Through molecular dynamics simulation of TAU protein and its isoforms, we obtain atomic information, of the interactions between conformational changes dependent on the phosphorylated AT100 and AT8 isoforms and the WT proteins. These results help us to understand the development of PHF's formation and the progression of AD.

STRUCTURE-FUNCTION ANALYSIS OF DNA LIGASE VI AND ITS ROLE IN DNA DAMAGE IN PLANTS ORGANELLES

Claudia D. Raygoza, Corina Elizabeth Díaz Quesada, Jazmín Abraham-Juárez and Luis G. Brieba, Unidad de Genómica Avanzada, Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV-Irapuato, Guanajuato, México 36821, claudia.raygoza@cinvestav.mx

Palabras clave: AtLIG6, Double Strand-Breaks, DNA Damage Repair

Introducción. Plants harbor three genomes in their cells, the nuclear genome and the genomes of mitochondria (mtDNA) and chloroplasts (ptDNA). These genomes are subjected to different types of stress, which cause alterations to the DNA structure, causing loss of information and even cell death. The main damages are divided into two groups, the first, single strand damage and the second, double strand damage, of all these damages, the most lethal is double-strand breaks (DSB)¹. DNA ligases are enzymes that join two DNA fragments by forming phosphodiester bonds. Plants require multiple DNA ligase activities to support replication, repair, and recombination activities in the three genomes located in the nucleus, mitochondria, and chloroplast, leading to the likelihood that multiple DNA ligase genes are present in plants². The genomes of the organelles do not encode a DNA ligase, and this activity must be imported from the cytosol to both organelles and the nucleus³. When sequencing the *Arabidopsis thaliana* genome, three DNA ligases were identified, among which one that has not been characterized was identified, which they called AtLIG6². In the case of plants, AtLIG6 presents high levels of expression in floral tissues and meristems, such as seeds, buds, and flowers. The expression in vegetative tissue indicates that the role of AtLIG6 is not restricted only to meiotic recombination but may also be involved in DNA repair and/or replication processes². In this work, the role of AtLIG6 in the repair of double-strand breaks in *A. thaliana* organelles will be evaluated.

Metodología. Subcellular location. To determine the presence of the enzyme in both organelles, localization was first observed through transient expression in *N. benthamiana* plants and subsequently, through stable expression in *A. thaliana* protoplasts using organelle marker lines (mt and pt)⁴. In vitro biochemical characterization of AtLIG6. To confirm that the enzyme is active, AtLIG6 was expressed in *E. coli* strains, it was purified by IMAC, and the activity of AtLIG6 was subsequently evaluated by ligation assays, nuclease assays, and double-strand break repair assays^{5,6}. Protein-protein interactions of AtLIG6. Possible interactions of AtLIG6 with other enzymes will be obtained using BiFC and microscale thermophoresis^{7,1}.

Resultados. A prediction was made using the LOCALIZER server (<https://localizer.csiro.au/>) in which we found a signal peptide from AtLIG6 to the nucleus, mitochondria and chloroplast. The structure of the protein was obtained by modeling in AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) and PyMol (<https://pymol.org/2/>), in which the nuclease domains are shown in the N-terminus and ligase at the C-terminus. Finally, it was possible to visualize the protein in the nucleus of *N. benthamiana*, as well as its possible presence in organelles.

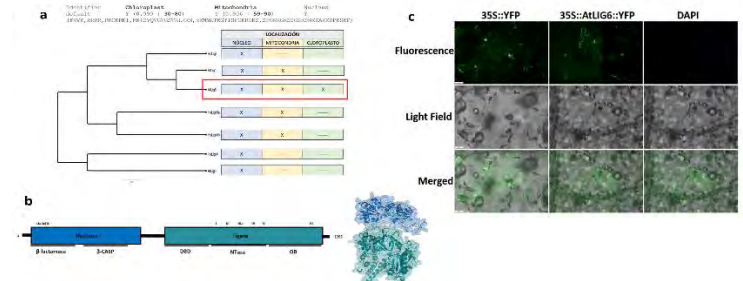


Fig1. Location and structure of the AtLIG6. a) Location prediction using LOCALIZER. b) Modeling of the AtLIG6 enzyme where its nuclease and ligase domains are observed. c) Subcellular localization in the nucleus of *N.benthamiana*.

Conclusiones. ADN ligase VI is an enzyme present in the plant nucleus and possibly in both organelles. It has a nuclease domain and ligase domain. Its activity and the role it plays in plants are still unknown.

Agradecimientos. We thanks CONACYT for the PhD's fellowship and UGA-LANGEBIO for the facilities.

Bibliografía.

- García-Medel, P. L., Baruch-Torres, N., Peralta-Castro, A., Traviñas-Arenas, C. H., Torres-Larios, A., & Brieba, L. G. (2019). NAR, 1–17.
- Sunderland, P. A., West, C. E., Waterworth, W. M., & Bray, C. M. (2006). Plant J, 47(3), 356–367.
- Waterworth, W. M., Masnavi, G., Bhardwaj, R. M., Jiang, Q., Bray, C. M., & West, C. E. (2010). Plant J, 63(5), 848–860.
- Nelson, B. K., Cai, X., & Nebenführ, A. (2007). Plant J, 51(6), 1126–1136.
- Wu, Y., Hohn, B., & Ziemienowicz, A. (2001). Characterization of an ATP-dependent type I DNA ligase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol., 161–170.
- Yosaatmadja, Y., Baddock, H. T., Newman, J. A., Bielinski, M., Gavard, A. E., Mukhopadhyay, S. M. M., Dannerfjord, A. A., Schofield, C. J., McHugh, P. J., & Gileadi, O. (2021). NAR, 49(16), 9310–9326.
- Kerppola, T. K. (2006). Nat. Protoc. 1(3), 1278–1286

EVALUACIÓN *IN SÍLICO* DE PÉPTIDOS DE AFINIDAD A BIOMARCADORES PROTEICOS PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA DE NEFROPATÍA DIABÉTICA

Melchor Andrés Soto Herrera, Ana Laura Torres Huerta, Aurora Antonio Pérez. a01746241@tec.mx.
Departamento de Bioingeniería, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Instituto Tecnológico De Estudios Superiores De Monterrey, Campus Estado de México, Atizapán de Zaragoza, CP. 52926.

Palabras clave: Nefropatía diabética, biomarcadores, péptidos de afinidad.

Introducción. La nefropatía diabética (ND) es una enfermedad renal, comúnmente asintomática, que provoca una disminución en la capacidad de filtración renal. Mundialmente, 1 de cada 3 personas con diabetes padecen ND [1]. En los últimos años, se han descubierto biomarcadores presentes en pacientes con indicios de desarrollo temprano de ND, los cuales tienen potencial para brindar un diagnóstico temprano en contraste con los actuales [2]. Durante el desarrollo de este trabajo, se explora la interacción de dos biomarcadores urinarios proteicos con potencial de diagnóstico temprano de DN, evaluados utilizando HDock [3] y PyMol.

Metodología. Considerando las condiciones de aplicación de los biomarcadores, así como una amplia evidencia literaria de su presencia significativamente diferenciada en etapas tempranas del desarrollo de ND, los biomarcadores seleccionados fueron: lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) y serotransferrina. Los bioreceptores peptídicos, especificados en Tabla 1, fueron seleccionados tomando en cuenta que serán incorporados a un circuito genético, su afinidad y especificidad reportada hacia los biomarcadores seleccionados [4][5]. Se realizó docking molecular proteína-péptido utilizando HDock. Se analizaron las interacciones polares de los 10 modelos con mayor *confidence score* en PyMol.

Resultados. El sistema de puntuación de HDock indica una métrica de predicción de afinidad, donde un *confidence score* mayor a 0.7 indica una alta posibilidad de afinidad entre las dos moléculas analizadas (Tabla 1).

| Biomarcador | Peptide Bioreceptor | Docking score | Confidence score |
|------------------|-------------------------------|----------------------|------------------|
| NGAL | DRWVARDPA SIFGGGGSC [4] | -266.4 - - 212.71 | 0.91 - 0.77 |
| Serotransferrina | CGGGHKYLR W [5] | -230.9 - - 193.07 | 0.83 - 0.70 |

Tabla 1. Resultados de docking molecular de biomarcadores y bioreceptores peptídicos.

Los residuos con interacciones polares entre cadenas del bioreceptor con la serotransferrina fueron: H5-N503, K6-T625, Y7-539, R9-S389 y W10-N509, rondando entre 1.7-3.3 Å; así mismo, las interacciones polares entre el bioreceptor con NGAL fueron R6-K124, D7-Q127, S10-T103, G13-T54, G14-R81 y S16-Q28, rondando entre 2.6-3.6 Å.

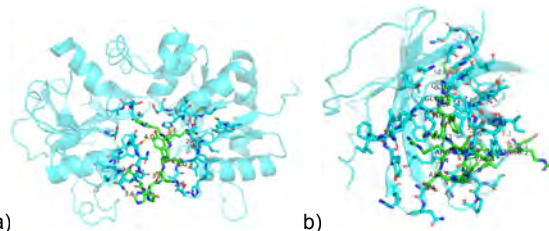


Fig. 2. a) Sitio activo e interacciones polares del modelo 1 de docking molecular visto con PyMol de la serotransferrina y su bioreceptor peptídico. b) Sitio activo e interacciones polares del modelo 1 de docking molecular visto con PyMol de la NGAL y su bioreceptor peptídico.

Conclusiones. La evaluación *in silico* de la afinidad de los bioreceptores peptídicos a NGAL y serotransferrina conduce a potencializar el empleo de ambos elementos (receptor-biomarcador) en el diseño de un circuito genético acoplado a la detección temprana de ND.

Agradecimiento. Se agradece al Tecnológico de Monterrey por proveer profesores asesores y equipo de laboratorio. Se agradece al equipo de iGEM TEC CEM por el apoyo en el estudio literario.

Bibliografía.

- De los Ríos Castillo, J. L., Sánchez Sosa, J. J., Barrios Santiago, P. y Avila Rojas, T. L. (2005). Calidad de vida en pacientes con nefropatía diabética. *Investigación y Educación en Enfermería*, 23(1), 30-61.
- Campion, C. G., Sanchez-Ferras, O. y Batchu, S. N. (2017). Potential role of serum and urinary biomarkers in diagnosis and prognosis of diabetic nephropathy. *Canadian journal of kidney health and disease*, 4, 2054358117705371.
- Yan, Y., Tao, H., He, J., & Huang, S. Y. (2020). The HDock server for integrated protein-protein docking. *Nature protocols*, 15(5), 1829-1852.
- Santi, M., Maccari, G., Mereghetti, P., Voliani, V., Rocchiccioli, S., Ucciferri, N., y Signore, G. (2017). Rational design of a transferrin-binding peptide sequence tailored to targeted nanoparticle internalization. *Bioconjugate chemistry*, 28(2), 471-480.
- Wei, Y., Gu, X., Sun, Y., Meng, F., Storm, G. y Zhong, Z. (2020). Transferrin-binding peptide functionalized polymersomes mediate targeted doxorubicin delivery to colorectal cancer in vivo. *Journal of controlled release*, 319, 407-415.

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNA DE SEMILLA DE GUAJE (*Leucaena esculenta*)

Beatriz Noyola Altamirano¹, Luis Gerardo Barriada Bernal², Laura Victoria Aquino González¹, Irene Chaparro Hernández¹, Andrea Selene López Díaz¹

¹ Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional; Unidad Oaxaca, ² Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Hornos 1003, Col. Noche Buena, C.P. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

*Autor de correspondencia: bnoyola2000@alumno.ipn.mx

Palabras clave: hidrolizados enzimáticos, potencial antioxidante, guaje

Introducción. Los hidrolizados enzimáticos de proteínas tienen varias aplicaciones en la industria alimentaria, desde la mejora nutricional y funcional de los alimentos, hasta su potencial nutraceutico. Se ha reportado que los péptidos presentes en los hidrolizados proteicos, además de ser macronutrientes básicos y funcionales, presentan una gran variedad de actividades biológicas que pueden tener un efecto benéfico en la salud humana: antioxidante, antitrombótico, antidiabético, antihipertensivo, entre otros (1).

El objetivo del presente trabajo es conocer el potencial antioxidante de los hidrolizados proteicos de semilla de guaje (*Leucaena esculenta*) obtenidos vía enzimática.

Metodología.

Hidrólisis. La hidrólisis enzimática de la fracción proteica obtenida de las semillas de *guaje* se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de Rezvankhah *et al.* (2021) (2). Se utilizaron 3 enzimas comerciales de grado alimenticio: *Aspergillus oryzae*, *Bacillus licheniformis* y Neutrasa. El proceso tuvo una duración de 4 horas, utilizando las siguientes condiciones relación E/S 1:10, pH 7 y 55°C. Inactivación enzimática a 95°C por 15 minutos.

Actividad antioxidante.

Método DPPH•. Se determinó utilizando la metodología de Brad-Williams *et al.* (1995) (3), con algunas modificaciones. La evaluación espectrofotométrica se realizó a una longitud de onda de 517 nm. Los resultados se expresaron en % de inhibición de la solución DPPH•.

Método ABTS•+. Se aplicó la metodología desarrollada por RE *et al.* (1999) (4), con modificaciones. La evaluación espectrofotométrica se realizó a 754 nm y los resultados se expresaron en % de inhibición del radical ABTS•+.

En los dos ensayos se utilizó como referencia la fracción proteica de semilla de guaje sin hidrolizar.

Resultados. El proceso de hidrólisis enzimática coadyuvó al incremento de las propiedades antioxidantes de los hidrolizados. En la Figura 1 se

puede observar que la hidrólisis con la enzima *A. oryzae* alcanzó un 50.82% de inhibición del radical DPPH•.

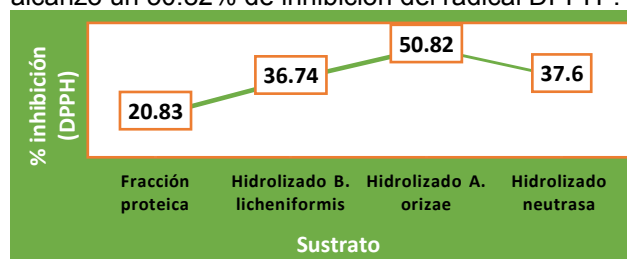


Fig. 1. Inhibición del radical DPPH• de hidrolizados de guaje

En la Figura 2 se observan los valores de inhibición del radical ABTS•+, siendo el hidrolizado con *A. oryzae* el que alcanzó el valor máximo de 97.34% de inhibición.

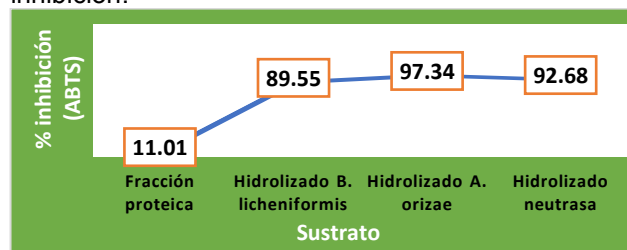


Fig. 2. Inhibición del radical ABTS•+ de hidrolizados de guaje

Conclusiones. El uso de enzimas en el proceso de hidrólisis, permite mejorar el potencial antioxidante *in vitro* de las fracciones proteicas de semilla de guaje. En ambos ensayos, la hidrólisis con la enzima *A. oryzae* alcanzó los mayores % de inhibición.

Agradecimiento. Se agradece al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por el apoyo financiero y facilidades otorgadas para la realización de la presente investigación.

Bibliografía.

- (1) Fariás *et al.* (2023). *Food Hydrocolloids for health*, 3:100-112.
- (2) Rezvankhah *et al.* (2021). *Journal of Food Measurement and Characterization*. Published Online.
- (3) Brad-Williams *et al.* (1995). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30.
- (4) RE *et al.* (1999). *Free Radical Biology & Medicine*, 26:1231-1237.