

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE INGENIERÍA
Departamento de Ingeniería Química



**IMPLEMENTACIÓN DE UNA PLATAFORMA PARA LA POLIMERIZACIÓN E INMOVILIZACIÓN
DE PROTEÍNAS DE RELEVANCIA INDUSTRIAL**

ANDREA BELÉN SAN MARTÍN CONCHA

Profesor Guía: Dr. Felipe Arenas Salinas

Trabajo de titulación presentado en conformidad a los
requisitos para obtener el título de Ingeniería en
Biotecnología

Santiago – Chile

2019

Resumen

Las enzimas poseen una amplia gama de aplicaciones en la industria, lo que ha llevado a desarrollar una serie de optimizaciones de los procesos mediados por dichos catalizadores biológicos que buscan un beneficio para el sector productivo. Un ejemplo de estas mejoras es el empleo de ingeniería e inmovilización de proteínas, dos disciplinas que combinadas pueden traducirse en una reducción en los costos de producción y en un mayor desarrollo en la industria de los catalizadores. Dado este contexto, la hipótesis de este trabajo es que por medio de una plataforma basada en biología molecular es posible implementar una estrategia de inmovilización y polimerización de enzimas, permitiendo recuperarlas luego de ser inmovilizadas en microesferas paramagnéticas, las que pueden ser fácilmente separadas y reutilizadas más tarde.

Para comprobar esta hipótesis se clonaron en un plásmido dos tecnologías de inmovilización ortogonales entre sí, HaloTag y AviTag, con el fin de que el gen de interés clonado entre estos pueda ser expresado y posteriormente inmovilizado en un soporte físico. Posteriormente se realizó el clonamiento de una enzima reportera entre las anclas moleculares para inmovilización y se envió a secuenciación. Los resultados dieron cuenta del exitoso clonamiento de una enzima reportera. Luego se rediseñó el plásmido, para un clonamiento fácil y orientado de enzimas de interés, clonando un fragmento que comprendía HaloTag y AviTag optimizado con un sitio de restricción adicional, enviándolo posteriormente a un servicio de secuenciación. Los resultados dieron cuenta que este diseño no fue elaborado de acuerdo con lo diseñado, por lo que su clonación no fue exitosa. Por otra parte, se expresaron y purificaron exitosamente proteínas que contienen tags para polimerización, SpyTag-SpyCatcher y SpyLigasa, una alternativa a la inmovilización mediada por HaloTag y AviTag, una alternativa a la inmovilización mediada por HaloTag y AviTag. Además, se realizaron ensayos de inmovilización sobre vidrios y cantiléveres funcionalizados con el Halo-ligando de HaloTag, inmovilizando exitosamente la enzima reportera GFP, entendiendo así el funcionamiento de la química HaloTag. Los experimentos seguirán realizándose durante 2020 cambiando la estrategia de clonamiento en el plásmido, realizando además las reacciones de polimerización con las plataformas purificadas y el ensayo de inmovilización en esferas paramagnéticas.

Esta Tesis forma parte del proyecto FONDECYT 11180705 bajo la supervisión del Dr. Jaime Andrés Rivas Pardo y fue realizada en el Laboratorio de Genómica de Microorganismos de la Universidad Mayor en colaboración con el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad de Santiago de Chile.

Dedicatoria

A mi mamá, Mery Concha, por siempre apoyarme a lo largo de la carrera en todo sentido, sin ti nada de esto habría sido posible. Gracias por tus consejos, retos y cariños, por amarme y apoyarme incondicionalmente, por los regalones después de un día duro, por celebrar mis triunfos en impulsarme a levantarme en mis derrotas.

A mi hermana Ruby y mis sobrinas Catalina, Alondra e Isabella, por estar con nosotras siempre, apoyarme y darme ánimo en los momentos difíciles.

A Jorge, Cristian, Israel y Benjamín, por estudiar conmigo y tenerme infinita paciencia cuando no entendía algo y por los buenos momentos vividos a lo largo de estos años. A la mesa té club de la USACH por siempre hacer amenos los almuerzos y compartir alegrías y penas a medida que íbamos pasando los ramos y los años.

A todos mis amigos, que siempre me dieron ánimo cuando me notaban triste o frustrada con palabras de aliento que me animaban a seguir.

A mis abuelos Nelva y Joaquín, por siempre apoyarme y estar pendientes de mí y mi Tesis. Gracias Tata por pensar en mí y si había enviado mi trabajo hasta tus últimos días, la tarea ya está hecha. Sé que me cuidas a mí y a toda tu familia desde arriba.

Muchas gracias a todos.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad de Santiago de Chile, por darme la oportunidad de realizar mi Unidad de Investigación y parte de mi Tesis de Pregrado en sus dependencias.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Fernanda Contreras. Gracias por enseñarme desde lo más básico hasta lo más complejo en cuanto al manejo de laboratorio, apoyarme y acompañarme en los experimentos.

Al Laboratorio de Genómica de Microorganismos de la Universidad Mayor, por abrirme las puertas para realizar mi Tesis de Pregrado. Gracias por ayudarme, aclarar mis dudas, y hacerme sentir parte de su equipo.

A mis profesores Dr. Felipe Arenas Salinas y Dr. Jaime Rivas Pardo, por confiar en mí y mis capacidades, por guiarme y entregarme conocimientos durante esta etapa, preocuparse de mí constantemente. Muchas gracias a ambos.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1 Uso de enzimas en la industria	1
1.2 Inmovilización de enzimas en la industria	2
1.2.1 HaloTag®	2
1.2.2 AviTag	3
1.2 Polimerización de proteínas	4
1.2.1 SpyTag-SpyCatcher	5
1.2.2 SpyLigasa	5
2. Objetivos	7
3. Materiales y métodos	8
3.1 Materiales	8
Reactivos químicos	8
Amortiguadores	8
Medios de cultivo	8
Plásmidos	8
Enzimas y proteínas	9
Cepas bacterianas	9
Partidores	9
3.2 Métodos	10
3.2.1 Amplificación del gen de la enzima glucoquinasa de <i>Thermococcus litoralis</i> (<i>TIGK</i>) mediante <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	10
3.2.2 Preparación de células quimiocompetentes	10
3.2.3 Transformación de células quimiocompetentes	10
3.2.4 Purificación de ADN plasmidial	11
3.2.5 Digestión con enzimas de restricción	11
3.2.6 Purificación de segmentos digeridos y productos PCR	12
3.2.7 Ligación de segmentos digeridos	12

3.2.8 Transformación de células quimiocompetentes con producto de ligación	12
3.2.9 Verificación de correcta ligación de fragmento y plásmido	13
3.2.10 PCR para verificación de inserción del gen <i>TIGK</i> y su direccionalidad	13
3.3. Expresión y purificación de proteínas SpyLigasa, SpyTag-SpyCatcher y HaloTag-Glucoquinasa.....	13
3.3.1 Inducción de la expresión de proteínas SpyLigasa, SpyTag-BLA-SpyCatcher, SUMO-KTag y HaloTag-Glucoquinasa	13
3.3.2 Purificación de proteínas.....	14
3.3.3 SDS-PAGE	14
3.4 Funcionalización de superficies con química HaloTag (vidrios y cantiléver)	14
4. Resultados y discusión.....	16
4.1 Objetivo 1: Desarrollo de librería de vectores	16
4.2 Objetivo 2: Expresión de proteínas tag	23
4.4 Funcionalización de superficies e inmovilización de HaloTag-GFP	26
5. Proyecciones	29
6. Conclusiones	31
7. Bibliografía.....	32

Índice de figuras

Figura 4.1. Inserción de <i>TIGK</i> en el vector pFN18a HaloTag-AviTag.....	16
Figura 4.2. Gel analítico de agarosa al 1% con resultados de PCR para amplificación de gen <i>TIGK</i>	17
Figura 4.3. Verificación de inserción del gen <i>TIGK</i> en el plásmido pFN18a-HaloAvi.	18
Figura 4.4. Verificación de direccionalidad del gen <i>TIGK</i> clonado en el plásmido pFN18a-HaloAvi.	18
Figura 4.5. Implementación de un vector para inmovilización de proteínas con clonamiento facilitado.	19
Figura 4.6. Gel preparativo de agarosa al 1% con digestión de plásmido pFN18a HaloAvi vacío. .	20

Figura 4.7. Gel preparativo de agarosa al 1% para la digestión del plásmido pUC57 HaloAvi-SacII.	21
Figura 4.8. Gel analítico de agarosa al 1% con digestión de plásmido pFN18a HaloAvi-SacII con enzimas de restricción <i>EcoRI</i> y <i>SacII</i> para verificación de clonamiento de inserto.	22
Figura 4.9. Expresión y purificación de proteínas.	23
Figura 4.10. Gel de poliacrilamida al 15% SDS.	24
Figura 4.11. Gel de poliacrilamida al 10% SDS.	25
Figura 4.12. Paso a paso de la química de superficies HaloTag.	26
Figura 4.13. Inmovilización de proteína control reportera HaloTag-GFP en cantiléver funcionalizado con Halo-ligando.	27
Figura 4.14. Inmovilización de HaloTag-GFP como proteína reportera para la inmovilización de vidrios.	28
Figura 5.1. Técnica de PCR con partidores de tipo puente o bridge.	29

Índice de Tablas

Tabla 3.1. Partidores para la amplificación y verificación del gen <i>TIGK</i>	9
---	---

1. Introducción

1.1 Uso de enzimas en la industria

Desde el asentamiento de las primeras civilizaciones humanas, el empleo de microorganismos para la transformación de sustancias ha sido una actividad en constante exploración y descubrimiento. La extraordinaria capacidad de ciertos microorganismos de generar nuevos productos a partir de materias primas, llevó a que antiguas civilizaciones como Babilonios e incluso Sumerios, usaran ya en el 6000 AC levaduras para la preparación de bebidas alcohólicas a partir de cebada (Singh et al., 2016). Hoy en día sabemos que específicamente son las enzimas las moléculas responsables de llevar a cabo tales reacciones de transformación a nuevos productos. El uso y manejo de estos catalizadores biológicos ha evolucionado enormemente, llegando a formar parte de modernos procesos productivos industriales debido a sus formidables capacidades de acortar los tiempos de producción —catalización de procesos—, bajo gasto de energía, economía en comparación a catalizadores químicos —ya que no se consumen durante la reacción—, y además de ser amigables con el medio ambiente. (Choi et al., 2015; Illanes et al., 2013; S. Li et al., 2012). Normalmente, estos catalizadores biológicos, son obtenidos desde microorganismos productores, los cuales son fáciles de obtener y poseen un rápido crecimiento (Illanes et al., 2013). Además, gracias a la tecnología de ADN recombinante e ingeniería de proteínas, es posible modificar los microorganismos que expresan estas enzimas y pueden ser cultivados en grandes cantidades, pudiendo responder a las crecientes demandas del mundo moderno (Liu et al., 2013).

Hoy en día las enzimas son usadas en la producción de detergentes, la elaboración de cerveza y de otros productos fermentados, para la generación de productos farmacéuticos y cosméticos, inclusive la elaboración de papel (Singh et al., 2016). Debido a la amplia gama de aplicaciones que poseen las enzimas en la industria, es que se ha volcado cierto interés por desarrollar optimizaciones en los procesos mediados por dichos catalizadores biológicos que tengan como consecuencia un beneficio para el sector productivo. La aplicación de la ingeniería de proteínas junto con la inmovilización han sido dos actividades muy populares en dicha optimización (Bernal et al., 2018), traduciéndose como una reducción en los costos de producción y un mayor desarrollo en la industria de los catalizadores. Por otro lado, la ingeniería de proteínas ha emergido de la mano de la biología molecular y evolución de enzimas, ofreciendo alternativas para modificar enzimas según sea la necesidad. De este modo, la ingeniería de proteínas se transforma en una alternativa para sistemas complejos ofreciendo enzimas más eficientes y estables (Arnold, 2018).

La evolución dirigida de proteínas y enzimas —método que busca por medio de la introducción de sustituciones encontrar variantes de proteínas con actividades mejoradas— representa el método más versátil para adaptar las propiedades de la proteína de interés a las necesidades de las aplicaciones industriales. Los progresos en esta área se han visto impulsados por los rápidos

avances en las técnicas de biología molecular así como las tecnologías de detección *high-throughput*, aplicando técnicas de recombinación de ADN (Wong et al., 2006). De hecho, la academia ha reconocido los avances y desarrollos a la evolución dirigida entregándole el mayor de los galardones en ciencias —Nobel Lauréate— a Frances Arnold, profesora del Instituto de Tecnologías de California. Sus desarrollos han permitido un sinnúmero de avances tecnológicos que han impactado en el desarrollo de enzimas con actividades mejoradas enfocadas para el sector productivo (Schmidt-Dannert & Arnold, 1999).

1.2 Inmovilización de enzimas en la industria

La inmovilización de enzimas corresponde al confinamiento físico de éstas en ciertas regiones del espacio para retener su actividad catalítica (Arroyo, 1998; Cacicedo et al., 2019). El objetivo de la inmovilización de enzimas es convertir estos catalizadores biológicos en un biocatalizador robusto capaz de trabajar en condiciones operativas no nativas y desfavorables, con una vida útil prolongada, ya que se pueden reutilizar repetidamente (Cacicedo et al., 2019). Sin embargo, la inmovilización sobre matrices suele ser no dirigida y estar basada en una química de grupos funcionales presentes en toda la superficie de la proteína, por lo que no existe un control sobre la inmovilización (Arroyo, 1998). Por esta razón es que la estabilización del catalizador por medio de la inmovilización tiene muchas veces como costo comprometer la eficiencia catalítica de la enzima en cuestión.

En el presente trabajo, se han implementado dos estrategias basadas en ingeniería de enzimas que permiten expresar proteínas de fusión conteniendo las tecnologías HaloTag® y AviTag™, las cuales fueron diseñadas para diversos fines, incluyendo la inmovilización de enzimas. Por medio del desarrollo de una prueba de concepto, se implementaron en un sistema que permite expresar enzimas que poseen anclas moleculares para inmovilización covalente sobre superficies derivatizadas.

1.2.1 HaloTag®

Esta tecnología se diseñó para superar las limitaciones actuales de las plataformas tradicionales de etiquetado de proteínas al permitir realizar análisis integrales de proteínas utilizando una sola construcción genética (Los et al., 2008). Esto se logró utilizando un enfoque de dos pasos: el desarrollo de una enzima —HaloTag®—, la cual está genéticamente fusionada con la proteína de interés; y un alcano halogenado (ligando HaloTag®) específico que puede incluir múltiples grupos funcionales para posterior derivatización. Cuando ambos, HaloTag® y el haluro-alcano entran en contacto, un enlace covalente se forma entre la proteína dando como resultado una unión rápida e irreversible (Los et al., 2008). El mecanismo molecular de este sistema se basa en una enzima dehalogenasa haloalcano mutante de la bacteria *Rhodococcus rhodocrous*, la cual forma un

intermedio alquil-enzima durante el desplazamiento nucleofílico del cloruro terminal del alcano por parte del residuo Asp106. En la dehalogenasa de tipo silvestre el residuo His272 funciona como una base que cataliza la hidrólisis del alcano liberando así la enzima. No obstante, esta reacción está ausente en la halogenasa de la plataforma HaloTag, ya que en este caso el residuo His272 está sustituido por Fen272, por lo tanto es incapaz de catalizar la hidrólisis, resultando en un aducto covalente de alta estabilidad (Los et al., 2005, 2008).

Dentro de las variadas aplicaciones que posee la tecnología HaloTag, se encuentra la inmovilización de macromoléculas —proteínas—, lo que se logra uniendo el ligando HaloTag a una superficie sólida (Los & Wood, 2007). La proteína de interés expresada como fusión a HaloTag reacciona uniéndose al ligando, quedando unida al dicho soporte (Motejadded et al., 2010). La inmovilización de la enzima puede realizarse en microesferas paramagnéticas que pueden ser reutilizadas repetidamente, pudiendo reutilizarse también la enzima y permitiendo una fácil recuperación de producto (Motejadded et al., 2010).

En este trabajo se plantea incluir el HaloTag como un marco de lectura “río arriba” de nuestro gen de interés, generando una proteína de fusión que incluye esta ancla. Específicamente se plantea desarrollar un plásmido ingenierizado que pueda ser empleado para clonar fácilmente enzimas de interés.

1.2.2 AviTag

Es un péptido pequeño, que fusionado a una proteína de interés proporciona un sistema útil para muchas aplicaciones que incluyen expresión, localización, aislamiento, detección e inmovilización de dicha proteína. Su tecnología se basa en la biotilación de AviTag por biotina y en la unión específica y reversible de avidina o estreptavidina a la biotina (*AviTag™ Technology, protein biotinylation | Genecopoeia, s. f.*).

La interacción biotina-avidina, o estreptavidina, tiene características estructurales y funcionales únicas, como lo son su alta afinidad (constante de afinidad $10^{-13} - 10^{-15}$ M) y la especificidad de la interacción, siendo esta interacción no-covalente la más fuerte presente en la naturaleza (Chivers et al., 2011). La interacción con estreptavidina además de ser muy estable, posee la capacidad de mantener su estructura terciaria en presencia de una alta concentración de dodecil sulfato de sodio (SDS), un potente desnaturante (J. Wong et al., 1999). Dentro de las aplicaciones de AviTag™ se encuentran la de localización, detección e inmovilización de proteínas o enzimas, siendo este último con el fin para el que se utilizará en el presente trabajo (*AviTag™ Technology, protein biotinylation | Genecopoeia, s. f.*).

Se ha propuesto incluir esta secuencia “río abajo” de nuestro gen de interés, ofreciendo una segunda ancla molecular, ortogonal a HaloTag aumentando el repertorio de estrategias destinadas a la

inmovilización. De este modo, nuestro diseño se completaría con un ancla covalente en el N-terminal —HaloTag— y un ancla de naturaleza no-covalente en el C-terminal.

1.2 Polimerización de proteínas

Las etiquetas peptídicas son útiles para la purificación e identificación de proteínas, pero suelen unirse de forma débil y reversible, limitando la forma en que los péptidos pueden usarse para nanoensamblaje y biología sintética (Fierer et al., 2014). Es por lo anterior, que recientemente ha habido un interés en desarrollar etiquetas peptídicas que se unan fuertemente y de manera irreversible, pudiendo aplicarse para otros fines incluyendo es la polimerización de proteínas.

El desarrollo de la inmovilización reversible y polimerización de proteínas en soportes sólidos, se ha basado en el empleo de interacciones no covalentes y adsorción no hidrófoba. A pesar de que son estrategias sencillas y de cierta eficiencia —permiten liberar de forma íntegra el polímero resultante—, las interacciones de soporte de proteínas son al igual que la unión de péptidos, generalmente débiles (Murata et al., 2018). Por esta razón, es que se han desarrollado otras tecnologías de polimerización e inmovilización de proteínas con uniones e interacciones más robustas y rápidas, mejorando la afinidad y estabilidad de los péptidos empleados y reduciendo los tiempos de reacción. SpyTag-SpyCatcher junto con el desarrollo de SpyLigasa y SnoopLigasa (Buldun et al., 2018; Fierer et al., 2014; Li et al., 2014; Veggiani et al., 2016), se han convertido en una verdadera revolución en términos de la polimerización de proteínas. Las tres estrategias están basadas en la idea de “proteína dividida” o *split protein system*. El concepto se basa en que una proteína puede ser estructuralmente dividida en dos o más partes, y al ser expresados por separados y reunidos en solución, espontáneamente reconstituyen la molécula. A pesar de que esta idea no es nueva, no fue hasta la descripción de enlaces covalentes intramoleculares en las adhesinas de algunas bacterias Grampositivas que la tecnología se pudo implementar para el desarrollo de una estrategia basada en elementos que se unen por medio de enlaces covalentes (Zakeri et al., 2012). Actualmente, es posible expresar proteínas y concatenarlas por medio del empleo de segmentos de adhesinas de bacteria que son unidas covalentemente por medio de un enlace isopeptídico (Buldun et al., 2018; Fierer et al., 2014).

En el presente trabajo se plantea usar las tecnologías SpyTag-SpyCatcher y SpyLigasa, los cuales serán utilizados como polipéptidos de fusión para unir y polimerizar de manera rápida y robusta enzimas de interés a superficies u otras macromoléculas. Específicamente, se ha diseñado clonar y expresar enzimas con estas etiquetas para inmovilizarlas y polimerizarlas sobre superficies, incluyendo microesferas paramagnéticas.

1.2.1 SpyTag-SpyCatcher

Estos péptidos de fusión se generaron con el fin de etiquetar proteínas de forma que estas últimas se unieran rápidamente con alta afinidad y resistencia mecánica, al contrario de otros péptidos utilizados en la actualidad (Zakeri et al., 2012). La estrategia del SpyTag-SpyCatcher proviene del dominio CnaB2 de la proteína de unión a fibronectina FbaB de *Streptococcus pyogenes* (Spy), la cual contiene un dominio que posee un enlace isopeptídico que se forma de manera espontánea entre los residuos *Lis31* y *Asp117*. La división de este dominio en dos segmentos: un pequeño péptido de 13 residuos —SpyTag— el cual contiene un *Asp117*, y el resto de la proteína —SpyCatcher—, permite expresar la proteína como dos cadenas polipeptídicas independientes pero que cuando son reunidas en solución en cuestión de minutos se asocian formando el enlace isopeptídico *Lis31-Asp117* (Zakeri et al., 2012). La reacción se produce con alto rendimiento y en medio de diversas condiciones de pH, temperatura y tampón. SpyTag puede fusionarse en el terminal o internamente en la proteína de interés y reaccionar específicamente en la superficie celular de la membrana plasmática de líneas celulares derivadas de mamíferos (Zakeri et al., 2012). Por otra parte, se aplicó espectroscopía de fuerza dinámica de una sola molécula, con el fin de determinar cuán fuerte era este nuevo enlace de naturaleza covalente. Los autores presionaron con la punta de un cantiléver de un microscopio de fuerza atómica sobre una capa delgada de poliproteínas (SpyTag-SpyCatcher) adsorbidas en una superficie. La proteína polimerizada por medio de SpyTag-SpyCatcher, se adhirió a dicha punta, donde posteriormente puede aplicarse una determinada fuerza (Zakeri et al., 2012). El experimento, mostró que SpyTag no se separó de SpyCatcher hasta que la fuerza excedió 1 nN, donde los enlaces covalentes se rompen (Zakeri et al., 2012).

De manera conjunta, los experimentos anteriores demostraron que el enlace irreversible formado entre SpyTag y su compañero SpyCatcher es de naturaleza irreversible y ocurre en condiciones de reacción robustas, pudiendo usarse en imágenes de células vivas de mamíferos y también potencialmente en sistemas de mamíferos transgénicos. SpyTag permite nuevas posibilidades para probar el efecto de la fuerza en las células y para crear nuevas arquitecturas de proteínas (Zakeri et al., 2012).

1.2.2 SpyLigasa

Tal como se mencionó en la sección anterior, el dominio CnaB2 de la proteína de adhesión a fibronectina FbaB de *S. pyogenes* (Spy), puede ser dividida en dos partes: SpyTag que contiene el *Lis31* reactivo y SpyCatcher que incluye el resto de la proteína (Zakeri et al., 2012). De este modo, la tecnología SpyTag-SpyCatcher permite comunicar dos cadenas polipeptídicas por medio de enlaces covalentes isopeptídicos. Recientemente, la tecnología de proteína dividida —o *split protein technique*— se ha llevado a un nuevo nivel, tornando la estrategia SpyTag-SpyCatcher aún más

compatible con los sistemas de proteínas. Se estableció que el dominio CnaB2 puede ser dividido en tres partes: SpyTag, el cual se dejó sin mayores cambios; expresó por separado la última hebra de la cadena que contiene *Lis* reactivo y se denominó KTag; finalmente el antiguo SpyCatcher se modificó, eliminando los residuos de la cadena que contiene el *Lis* reactivo y reemplazando los residuos de C terminal de CnaB2 con un conector *Gly/Ser*, cadena polipeptídica que se denominó SpyLigasa (Fierer et al., 2014). De este modo, dos proteínas o macromoléculas pueden ser comunicadas de manera covalente por simplemente incluir un péptido SpyTag y KTag en su secuencia, unión covalente que es catalizada por la “enzima” SpyLigasa (Fierer et al., 2014). La pequeña cicatriz que queda luego de unir ambas cadenas polipeptídicas aumenta la versatilidad de esta técnica, permitiendo implementarla en prácticamente cualquier sistema de inmovilización y polimerización de proteínas.

A partir de los antecedentes presentados, la hipótesis planteada en el presente trabajo es que por medio de una plataforma basada en biología molecular es posible implementar una estrategia de inmovilización y polimerización de enzimas, permitiendo recuperarlas luego de ser inmovilizadas en microesferas paramagnéticas, las que pueden ser fácilmente separadas y reutilizadas más tarde.

2. Objetivos

Objetivo general

Desarrollar una plataforma basada en biología molecular para la polimerización e inmovilización de proteínas de fusión de interés

Objetivos específicos

1. Clonar la enzima glucoquinasa con anclas para inmovilización y rediseñar plasmidio de anclaje para clonación facilitada y orientada.
2. Expresar las proteínas tag: SpyTag-SpyCatcher, SpyLigasa, y HaloTag-Glucoquinasa (HaloTag-TIGK).
3. Validar la plataforma a través de un ensayo de inmovilización y bioquímico de la enzima glucoquinasa inmovilizada sobre microesferas.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

Reactivos químicos

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), amortiguador fosfato salino (PBS), leupeptina, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), fosfato de sodio, cloruro de sodio, imidazol, 40% acrilamida, tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), dodecilsulfato sódico (SDS), persulfato de amonio, N',N',N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), azul de Coomasie, ácido acético glacial, metanol de grado técnico, glicina, ácido clorhídrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), agarosa, estándar de tamaño molecular 1 kilobase (1 Kb DNA Ladder, estándar de amplio rango para geles SDS-PAGE, ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, cloruro de calcio (CaCl_2), glicerol, (3-aminopropil)trióxido de silano (APTES), glutaraldehído, Hellmanex III, etanol, dNTPs, agua destilada y agua libre de nucleasas.

Amortiguadores

Amortiguador de unión (fosfato de sodio pH 7,4 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, imidazol 20 mM), amortiguador de elución (fosfato de sodio pH 7,4 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, imidazol 0,5 M), amortiguador de carga para geles de poli(acrilamida) (SDS, β -mercaptoetanol, azul de Coomasie), amortiguador TAE (Tris, ácido acético glacial, EDTA pH 8 0,5 M)

Medios de cultivo

Medio líquido Luria-Bertani (LB) (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L) y medio agar Luria-Bertani (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L y agar 15 g/L), obtenidos desde BD.

Plásmidos

pFN18a HaloTag®, obtenido de Promega, fue modificado con un AviTag™ terminal. pET28a SUMO-KTag, pET28a SpyTag-BLactamasa (BLA)-SpyCatcher y pDEST14 SpyLigasa fueron obtenidos desde AddGene. Finalmente el plásmido comercial pUC57-HaloAvi-SacII fue ordenado a GeneScript.

Enzimas y proteínas

Enzimas de restricción *EcoRI*-HF, *BamHI*-HF, *BamHI*, *SacII*, *KpnI*, *BglI*, Quick Ligase, ADN Ligasa T4, ADN polimerasa GoTaq y ADN polimerasa Q5 fueron obtenidas desde New England BioLabs® Inc., TEV.

Proteína HaloTag-Proteína Verde Fluorescente (GFP) purificada con anterioridad, albúmina de suero bovino (BSA).

Cepas bacterianas

E. coli XL10 Gold® para clonamiento fueron obtenidas desde Stratagene, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS para expresión fueron obtenidas desde Novagen.

Partidores

Los partidores mostrados en la Tabla 3.1 fueron obtenidos desde IDT (Integrated DNA Technologies).

Tabla 3.1. Partidores para la amplificación y verificación del gen *TIGK*. Fw y Rev *TIGK* corresponden a partidores que flanquean el gen de la enzima *TIGK* y contienen las secuencias de las enzimas *BamHI* y *BglI* respectivamente, mientras que T7 Ter, corresponde a una secuencia presente en el vector pFN18a.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Fw <i>TIGK</i>	GACGGATCCATGAAGGAAAGCCTTAAAGATAGG
Rv <i>TIGK</i>	AGATCTCCTTTTCCTCATGCCAAATTCAC
T7 Ter Rv	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

3.2 Métodos

3.2.1 Amplificación del gen de la enzima glucoquinasa de *Thermococcus litoralis* (TIGK) mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Con el fin de amplificar el gen de la enzima TIGK a partir del plásmido pQE80L, se realizó un PCR empleando la ADN polimerasa Q5 y los partidores Fw y Rv TIGK (Tabla 3.1), siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Brevemente el protocolo consiste en mezclar 10 µL de amortiguador de reacción Q5 5X, 1 µL de dNTPs (10 mM), 2,5 µL de Fw TIGK (10 µM), 2,5 µL de Rv TIGK (10 µM), 2 µL de ADN plasmidial con una concentración total de 1 ng, 0,5 µL de ADN polimerasa Q5 y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 50 µL, posteriormente se depositó la muestra en un termociclador programando el ciclo térmico con una denaturación inicial a 98°C por 30 segundos, seguida de 25 a 35 ciclos a 98°C por 10 segundos, 50-72 °C por 10 a 30 segundos (Tm de partidores), 72°C por 20 a 30 segundos/kb de extensión de plásmido, finalizando el ciclo con una extensión final a 72°C por 2 minutos.

3.2.2 Preparación de células quimiocompetentes

Para preparar células competentes para la transformación con ADN foráneo, se crecieron las células *E. coli* XL10 o *E. coli* BL21 pLysS en 200 µL de medio LB líquido durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó una dilución 1:100 en 20 mL de medio LB líquido y se incubaron a 37°C hasta una densidad óptica (DO) entre 0,6 y 0,9. Posteriormente, se transfirieron los cultivos a tubos cónicos de 50 mL, manteniéndolos en hielo durante 10 minutos. Luego del tiempo transcurrido, dichos cultivos se centrifugaron a 9000 RPM a 4°C por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El centrifugado restante se resuspendió en 12,5 mL de CaCl₂ 0,1 M frío y estéril, nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones mencionadas y se descartó el sobrenadante. Finalmente, resuspendió el centrifugado obtenido en 3,5 mL de CaCl₂ y 1 mL de glicerol 50%, y se alicuotaron las células de 100 µL en tubos Eppendorf, almacenándolas a -80°C.

3.2.3 Transformación de células quimiocompetentes

Con el fin de purificar el plásmido pFN18a HaloTag-TIGK-AviTag, pFN18a HaloAvi y el plásmido comercial que contiene el fragmento HaloAvi-SacII, se transformaron células *E. coli* XL10 quimiocompetentes añadiendo 2 µL de ADN plasmidial a 100 µL de células, por separado para cada ADN plasmidial. Luego se incubó la mezcla de ADN y bacterias en hielo durante una 1 hora, seguido por un breve golpe térmico a 42°C por 45 segundos desde donde se trasladaron de regreso al hielo inmediatamente. Luego, se agregó a cada tubo 250 µL de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se plaquearon en agar LB suplementado con antibióticos apropiados

(Tetraciclina-Ampicilina en el caso del plásmido pFN18a y Tetraciclina-Kanamicina en el caso de los plásmidos comerciales), incubando las células durante toda la noche a 37°C.

Con la finalidad de expresar las proteínas SpyTag, SUMO-KTag, SpyLigasa y TIGK, se transformaron células *E. coli* BL21 pLysS quimiocompetentes con los plásmidos que contenían dichas proteínas, se siguió el protocolo anteriormente mencionado. Finalmente se plaqueó en agar LB suplementado con antibióticos adecuados (Cloranfenicol-Kanamicina en el caso de pET28a SpyTag y pET28a SUMO-KTag y Cloranfenicol-Ampicilina en el caso de pDEST14 SpyLigasa y pFN18a HaloTag-TIGK-AviTag).

Para transformar células quimiocompetentes con producto de ligación, se siguió el mismo protocolo empleado, con la diferencia de que se agregaron 5 µL de producto. El resto del protocolo se realizó de la misma manera.

3.2.4 Purificación de ADN plasmidial

Para obtener el ADN plasmidial, se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). La concentración de ADN y la pureza obtenida se midió con un espectrofotómetro Infinite® M200 PRO NanoQuant de Tecan, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm, utilizando 2 µL por duplicado de cada muestra.

3.2.5 Digestión con enzimas de restricción

Para obtener el plásmido pFN18a vacío y el fragmento HaloAvi-SacII, se utilizaron las enzimas *EcoRI*-HF y *KpnI* en ambos plásmidos, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Brevemente, el protocolo consiste en mezclar 1 µg de ADN plasmidial con 5 µL de amortiguador CutSmart®, 1 µL de *KpnI*, 1 µL de *EcoRI*-HF y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 50 µL, e incubar a 37°C durante toda la noche.

Luego de purificar los amplicones del gen TIGK y también para abrir el plásmido pFN18a HaloAvi, se realizó una doble digestión con las enzimas *BamHI* y *BglII* el fragmento del gen y el vector mencionado, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Brevemente, el protocolo consiste en mezclar 1 µg del ADN a digerir, 5 µL de NEBuffer 3.1 10X, 1 µL de cada enzima de restricción y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final 50 µL, y posteriormente incubar a 37°C durante toda la noche.

3.2.6 Purificación de segmentos digeridos y productos PCR

Para obtener el ADN del plásmido pFN18a, del inserto HaloAvi-SacII, del gen de la enzima *TIGK* y de los plásmidos pFN18a Halo-*TIGK*-Avi y pFN18a HaloAvi-SacII, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1% con amortiguador TAE 1X, cargando 50 µL de la digestión o PCR previamente realizados y 25 µL de amortiguador de carga de electroforesis. Posteriormente, se utilizó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). La concentración de ADN y la pureza obtenida se midió con un espectrofotómetro Infinite® M200 PRO NanoQuant de Tecan, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm, utilizando 2 µL por duplicado de cada muestra.

3.2.7 Ligación de segmentos digeridos

Para ligar el gen *TIGK* al plásmido pFN18A HaloAvi, se utilizó la enzima ADN Ligasa T4, mientras que para ligar el fragmento HaloAvi-SacII al plásmido pFN18a, se utilizó la enzima ADN Ligasa T4 como el kit Quick Ligasa, siguiendo en ambos casos el protocolo indicado por el proveedor con una modificación en el tiempo de incubación y en la cantidad de inserto a ligar. Ya que el vector y el inserto poseen distintos pesos moleculares y cantidad de nucleótidos, la cantidad de inserto a ligar se calculó a partir de un factor de ligación de la siguiente forma (Contreras & Rivas-Pardo, 2020):

$$\text{Factor de clonación} = \frac{\text{Pares de bases del plásmido}}{\text{Pares de bases del inserto}} = F$$

$$\text{Cantidad de inserto} = \frac{500 \text{ ng}}{F}$$

Brevemente, la ligación con la enzima Quick Ligasa se realizó mezclando 10 µL de amortiguador de reacción de Quick Ligasa 2X, 50 ng de ADN vector, 170 ng de ADN inserto, agua libre de nucleasas hasta un volumen de 20 µL y finalmente 1 µL de Quick Ligasa. La ligación con Ligasa T4 se realizó mezclando las mismas cantidades de componentes mencionados, exceptuando el amortiguador T4 ADN Ligasa, del cual se utilizaron 2 µL para la reacción. La reacción mediada por Quick Ligasa se incubó a temperatura ambiente durante media hora, mientras que la reacción Ligasa T4 se incubó a 16°C durante toda la noche.

3.2.8 Transformación de células quimiocompetentes con producto de ligación

Para posteriormente purificar el producto de ligación, se transformaron células *E. coli* XL10 siguiendo el protocolo mencionado anteriormente en el punto 3.2.2, con la diferencia que se usaron 5 µL de producto de ligación para transformar dichas células.

3.2.9 Verificación de correcta ligación de fragmento y plásmido

Para verificar la correcta ligación del plásmido pFN18a y el fragmento HaloAvi-SacII, se realizó una digestión con las enzimas *EcoRI*-HF y *SacII*, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor indicado brevemente en el punto 3.2.4, y posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% con amortiguador TAE 1X para visualizar el inserto liberado por la digestión. Posteriormente se seleccionaron los clones y se enviaron a secuenciación.

3.2.10 PCR para verificación de inserción del gen *TIGK* y su direccionalidad

Con el fin de verificar la correcta clonación del gen de la enzima *TIGK* en el plásmido pFN18a y su direccionalidad en el plásmido pFN18a, se realizó un PCR empleando ADN polimerasa GoTaq. Para corroborar el clonamiento del gen se utilizaron los partidores Fw *TIGK* y Rv *TIGK*, mientras que para corroborar la dirección del gen en el plásmido se utilizaron los partidores Fw *TIGK* y T7 Ter Rv (Tabla 3.1). Se siguió el protocolo indicado por el proveedor, el cual brevemente consiste en mezclar 1,5 μ L de cada partidor a utilizar para cada reacción, 1 μ L de ADN plasmidial con una concentración total de 1 ng, 12,5 μ L de ADN polimerasa GoTaq y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 25 μ L. Posteriormente las reacciones se depositaron en un termociclador, donde se programó un ciclo térmico que incluye una denaturación inicial a 98°C por 30 segundos, 25 a 35 ciclos a 98 °C, 50-72°C por 10 a 30 segundos (T_m de partidores) y 72°C por 20 a 30 segundos/kb de extensión de la muestra a amplificar, seguido de una extensión final a 72°C por 2 minutos. Posteriormente se cargaron las muestras en geles de agarosa para ser visualizadas.

3.3. Expresión y purificación de proteínas SpyLigasa, SpyTag-SpyCatcher y HaloTag-Glucoquinasa

3.3.1 Inducción de la expresión de proteínas SpyLigasa, SpyTag-BLA-SpyCatcher, SUMO-KTag y HaloTag-Glucoquinasa (HaloTag-*TIGK*)

Se transformaron con los plásmidos pDEST-SpyLigasa, pDEST-SUMO-KTag, pET28a-SpyTag-BLactamasa-SpyCatcher y pFN18a HaloTag-*TIGK*-AviTag, en células *E. coli* BL21 pLysS quimiocompetentes. Luego de seleccionar clones y plaquearlos en agar LB-Ampicilina-Cloranfenicol en el caso de los plásmidos pDEST-SpyLigasa y pFN18a HaloTag-*TIGK*-AviTag y en LB-Kanamicina-Cloranfenicol en el caso de los plásmidos pET28a-SUMOKTag y pET28a-SpyTag-BLactamasa-SpyCatcher. Posteriormente se inoculó en 4 mL medio líquido LB, y se dejó crecer con agitación, toda la noche a 37°C. Seguidamente, se inoculó 400 mL de medio líquido LB suplementado con los antibióticos mencionados, y se dejó crecer con agitación a 37°C hasta una densidad óptica (DO) de 0,5 a 0,6 aproximadamente. Luego, se agregó IPTG 1 mM al cultivo y se dejó incubar a 37 °C con agitación, durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo a

9000 rpm, durante 30 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante, guardando el centrifugado a -80°C.

3.3.2 Purificación de proteínas

Para purificar la proteína de interés, se preparó un extracto crudo resuspendiendo el centrifugado obtenido anteriormente en 20 mL de PBS, luego se agregó 5 µL de leupeptina y 200 µL de PMSF como inhibidores de proteasas. Posteriormente y con el propósito de extraer la proteína contenida en las bacterias, se rompió la integridad celular por medio de sonicación. Cada muestra fue sonicada por medio de 6 pulsos de 1 minuto con una potencia de 33 Watts (amplitud del 60% de la potencia total del equipo) seguida por pausas de 30 segundos para evitar el sobrecalentamiento de la dispersión ya contenida en hielo. Más tarde se centrifugó a 9000 rpm durante 30 minutos, rescatando el sobrenadante, manteniendo el extracto crudo en hielo.

Luego, se purificó la proteína por medio de cromatografía de afinidad, haciendo pasar el extracto crudo por una columna de sefarosa y cobalto. Posteriormente se lavó la columna con 40 mL de amortiguador de unión y se eluyó la proteína de interés con amortiguador de elución (imidazol 0,5 M), recolectando 15 fracciones de 0,6 mL aproximadamente. Cada fracción fue cuantificada a través de su absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Infinite® M200 PRO NanoQuant de Tecan.

3.3.3 SDS-PAGE

Para analizar la purificación realizada, se cargaron las muestras que presentaron mayor concentración en geles resolutivo al 10% y 12% SDS, y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en amortiguador de corrida. Las muestras se cargaron con amortiguador 5X SDS para geles de proteínas y se utilizó estándar de amplio rango para geles SDS-PAGE para determinar el peso molecular aproximado de las proteínas.

3.4 Funcionalización de superficies con química HaloTag (vidrios y cantiléver)

Con el fin de preparar las superficies a utilizar con HaloTag y Halo-ligando, se lavaron los vidrios y cantiléveres durante 30 minutos con detergente Hellmanex III (Hellma Analytics), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se lavaron con 10 volúmenes de agua destilada y se dejaron en etanol durante 30 minutos. Finalmente, dichas superficies se secaron con aire comprimido, cuidando de que en especial en los vidrios, no quedaran residuos de solvente que pudiesen entorpecer los pasos posteriores.

A continuación, se cubrieron las superficies con silano 1% (APTES) durante 20 minutos, se lavaron con etanol 5 veces y se secaron nuevamente con aire comprimido. Más tarde, se trasladaron hasta una estufa a 65°C, durante 20 minutos para contribuir en el secado total del vidrio.

Subsiguientemente, se preparó una solución de glutaraldehído 1% en amortiguador PBS y se añadió una alícuota de 20 μ L, para luego hacer un “sándwich” con cada par de vidrios, rotulando el lado contrario con el fin de identificar la cara funcionalizada. En el caso de los cantiléveres, cada uno se sumergió en una gota de glutaraldehído 1% de 20 μ L. Ambas superficies se dejaron incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se preparó el Halo-ligando, diluyendo la solución madre 500X en amortiguador PBS, para obtener una solución 1X (2,2 μ L de solución madre y 1,3 mL de amortiguador PBS). Luego, se depositó una alícuota de 20 μ L de Halo-ligando diluido, sobre cada superficie funcionalizada y se dejó reaccionar durante al menos 12 horas, en una cámara húmeda. En el caso de los cantiléveres se repitió el mismo procedimiento anterior, cada chip fue sumergido en una gota conteniendo el ligado de cloro-alcano.

Finalmente, y ya pasado el tiempo de incubación, se cubrieron las superficies con una gota de solución de BSA 1% en amortiguador PBS, con el fin de bloquear y disminuir la unión inespecífica HaloTag-vidrio. Las superficies se incubaron alrededor de 60 minutos en una cámara húmeda y se lavaron las superficies con el amortiguador mencionado, manteniéndolas en una cámara húmeda hasta el momento de ser empleadas en el experimento de inmovilización.

3.5 Inmovilización de proteína control reportera HaloTag-GFP

Para la inmovilización de proteínas con HaloTag, se depositó una gota de 3 μ L de proteína HaloTag-GFP en cada superficie ya funcionalizada con alcano y se dejó incubar en una cámara húmeda alrededor de 20 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se visualizaron los vidrios y cantiléveres con la proteína inmovilizada en un transiluminador.

Finalmente, se agregó una alícuota de 3 μ L de la enzima TEV sobre las superficies, incubándolas durante al menos 20 minutos y posterior al tiempo de incubación, se observaron en un transiluminador para confirmar la presencia o ausencia de proteína HaloTag-GFP.

4. Resultados y discusión

4.1 Objetivo 1: Desarrollo de librería de vectores

De acuerdo con la motivación experimental de este trabajo, que proponía el desarrollo de una plataforma para la inmovilización y polimerización de proteínas, el primer objetivo fue implementar una librería de vectores que permitieran la expresión de proteínas con anclas moleculares para inmovilización. En una primera instancia, se clonó en el vector pFN18a el gen de glucoquinasa de *Thermococcus litoralis* (*TIGK*) (Ito et al., 2001). Se escogió esta enzima ya que puede ser fácilmente usada como reportero en los ensayos de inmovilización, por medio de la medición de actividad enzimática (Rivas-Pardo et al., 2013). Además la enzima *TIGK* posee una serie de extraordinarias características de estabilidad que la hacen un candidato para ese tipo de ensayos referentes a su estabilidad estructural como funcional (Rivas-Pardo et al., 2013).

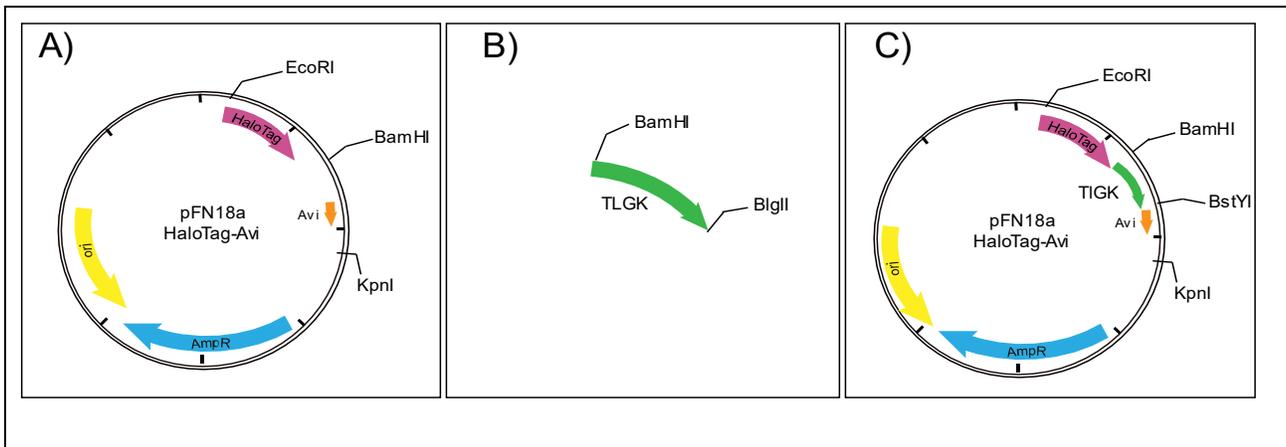


Figura 4.1. Inserción de *TIGK* en el vector pFN18a HaloTag-AviTag. A) Plásmido pFN18a que contiene un sitio de restricción *Bam*HI. B) Gen *TIGK* amplificado por PCR con partidores con extremos sobresalientes que incluyen los nuevos sitios para el clonamiento, *Bam*HI y *Bgl*II. C) Ligación resultante del gen *TIGK* y el vector pFN18a HaloTag-AviTag. Producto de que *Bam*HI y *Bgl*II ofrecen sitios compatibles, el gen de la enzima *TIGK* se liga reconstituyendo un sitio *Bam*HI en el extremo 5' mientras que en el otro extremo 3' se genera un nuevo sitio *Bst*YI producto de la combinación de *Bgl*II-*Bam*HI (Carrion-Vazquez et al., 1999).

En la **Figura 4.1** se muestra un esquema del clonamiento de la enzima *TIGK*, la cual consistió en el empleo de un par de enzimas cohesivas *Bam*HI y *Bgl*II. Este sistema cuenta con un paso previo de clonamiento usando los sitios *Eco*RI y *Bam*HI para insertar el gen HaloTag y la secuencia AviTag fue clonada utilizando *Bam*HI y *Kpn*I. La enzima *TIGK* fue amplificada por PCR con partidores que incluían en 5' el sitio de *Bam*HI (Fw *TIGK*) y en el 3' el sitio para *Bgl*II (Rv *TIGK*) descritos en la Tabla 3.1. El resultado de los amplicones que contienen el gen de la enzima se muestran en la **Figura 4.2**.

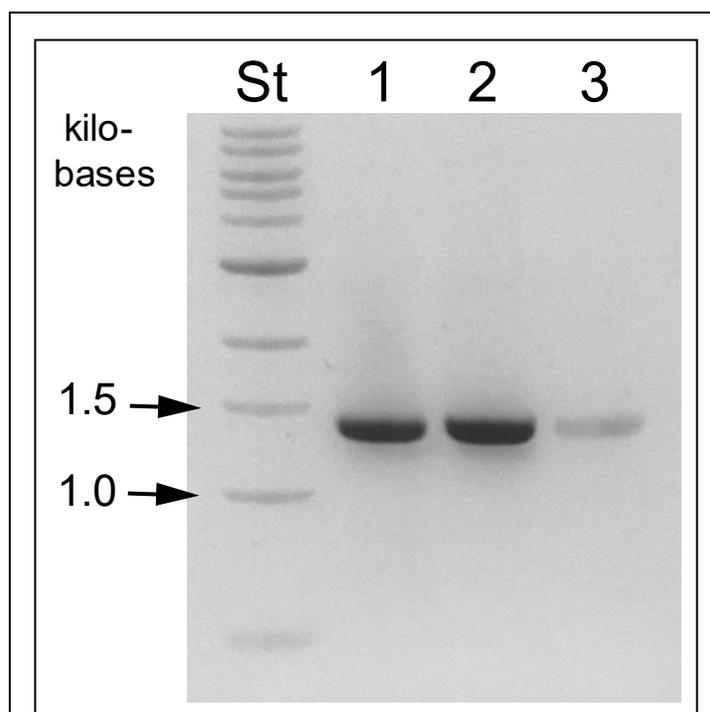


Figura 4.2. Gel analítico de agarosa al 1% con resultados de PCR para amplificación de gen *TIGK*.

Para obtener el gen de la enzima *TIGK*, se amplificó a partir del plásmido pQE80L, utilizando partidores que flanqueaban el gen, Fw y Rv *TIGK* (Tabla 3.1). En los carriles 1 y 2 se encuentran dos amplicones obtenidos. Estos se movilizan hasta aproximadamente 1,5 kb, lo cual coincide con el tamaño teórico esperado (~1416 pb).

Debido a que *Bam*HI y *Bgl*II son cohesivas entre sí, el clonamiento de la enzima *TIGK* puede ser o no orientado. De este modo es necesario realizar una búsqueda de los clones correctos mediante amplificación por PCR, verificando así la inserción del gen de la enzima y su direccionalidad. En el caso del gen, se comprobó su inserción a través de una amplificación por PCR con los mismos partidores que se utilizaron para amplificar el gen de la enzima *TIGK* (**Figura 4.3**) y para comprobar la correcta dirección del gen se utilizaron un set de partidores que hibridan justo al inicio del gen (Fwd *TIGK*) y fuera del gen en la región del terminador del vector (T7 Ter).

En el caso de que el gen este orientado apropiadamente, el amplicón coincide prácticamente con el tamaño del gen más un segmento correspondiente al vector (~1500 pb), mientras que si el gen está invertido, no hay producto de la amplificación debido a que ambos partidores están orientados en el

mismo (**Figura 4.4**). Luego de confirmar los clones apropiados para el trabajo, estos fueron almacenados para las siguientes experiencias.

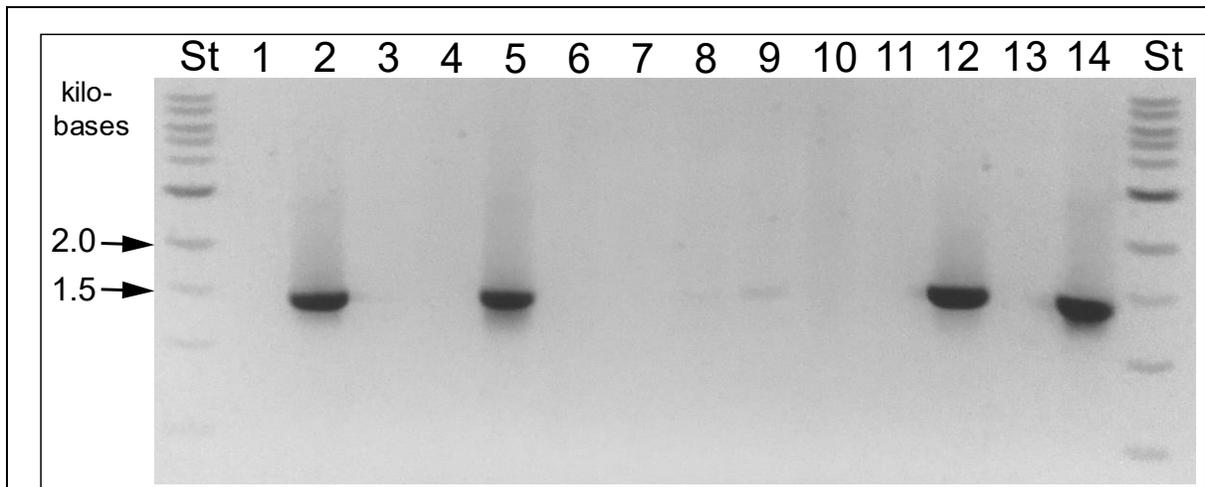


Figura 4.3. Verificación de inserción del gen *TIGK* en el plásmido pFN18a-HaloAvi. Se cargaron 14 clones distintos sometidos con anterioridad a PCR, utilizando los partidores Fw y Rv *TIGK* (Tabla 3.1) con el fin de obtener amplicones del gen inserto en el plásmido. Los clones de los carriles 2, 5, 12 y 14 resultaron tener inserto el gen de la enzima *TIGK*, ya que los amplicones obtenidos se movilizan bajo los 1,5 kb, coincidiendo con lo diseñado (~1416 pb).

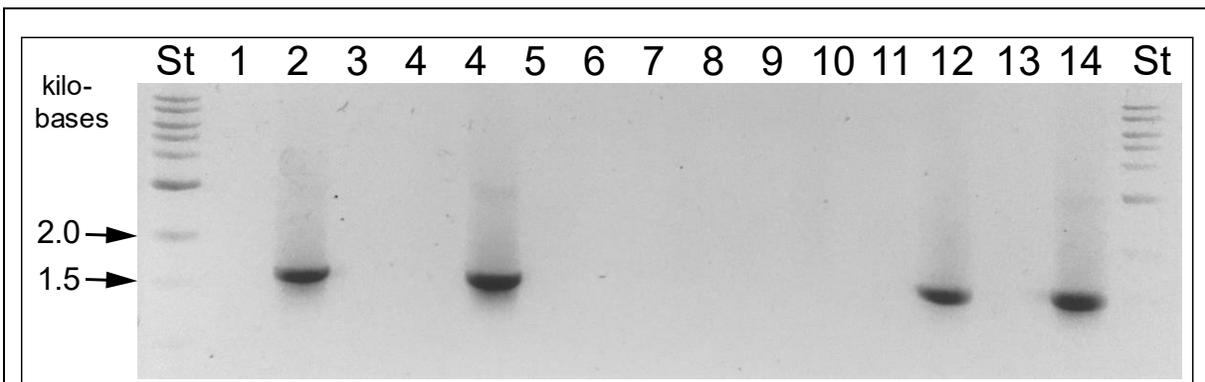


Figura 4.4. Verificación de direccionalidad del gen *TIGK* clonado en el plásmido pFN18a-HaloAvi. Se cargaron 14 clones distintos sometidos con anterioridad a PCR, utilizando los partidores Fw *TIGK* y T7 Ter (Tabla 3.1) con el fin de obtener amplicones que contuvieran parte de la secuencia de vector y el gen completo. Los clones de los carriles 2, 5, 12 y 14 resultaron tener inserto el gen de la enzima *TIGK*, ya que los amplicones obtenidos se movilizan hasta aproximadamente 1,5 kb, coincidiendo con lo diseñado (~1518 pb).

Debido a que el clonamiento con las anclas HaloTag y AviTag, junto con el empleo de los sitios cohesivos *Bam*HI y *Bgl*II generaban clones invertidos, se decidió mejorar la estrategia de clonamiento mediante la introducción de un nuevo sitio de restricción. Esto requirió la búsqueda de un sitio de restricción que estuviese ausente en la serie de sitios únicos empleados para el diseño y clonamiento del HaloTag y de AviTag y además fuera compatible con sistemas de doble digestión simultánea. El sitio escogido fue *Sac*II, que ofrecía ser un buen candidato para clonamiento orientado. La estrategia propuesta incluía la introducción del sitio mencionado mediante el reemplazo del segmento comprendido entre *Eco*RI y *Kpn*I. Este segmento se encargó a la compañía GenScript para su fabricación, facilitando el clonamiento por medio de la estrategia de doble digestión. El resumen de esta estrategia se presenta en la **Figura 4.5**.

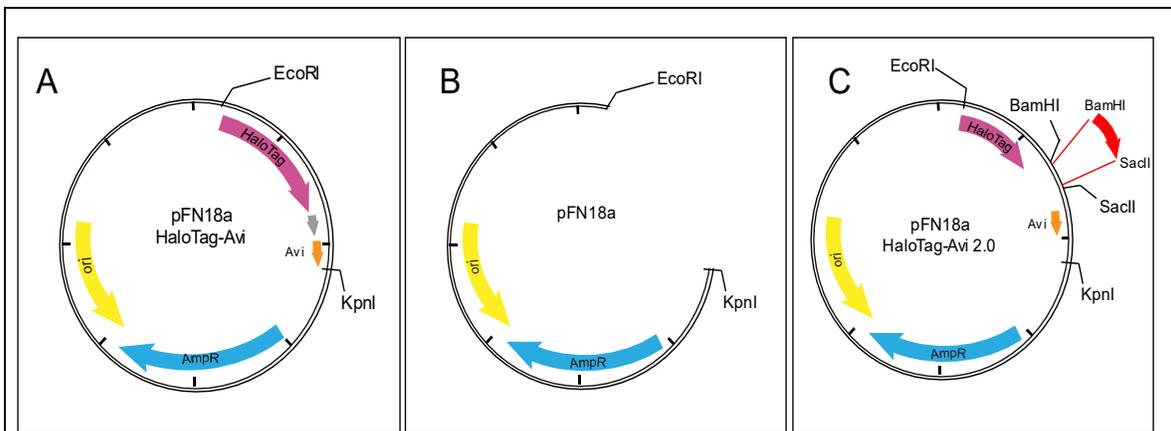
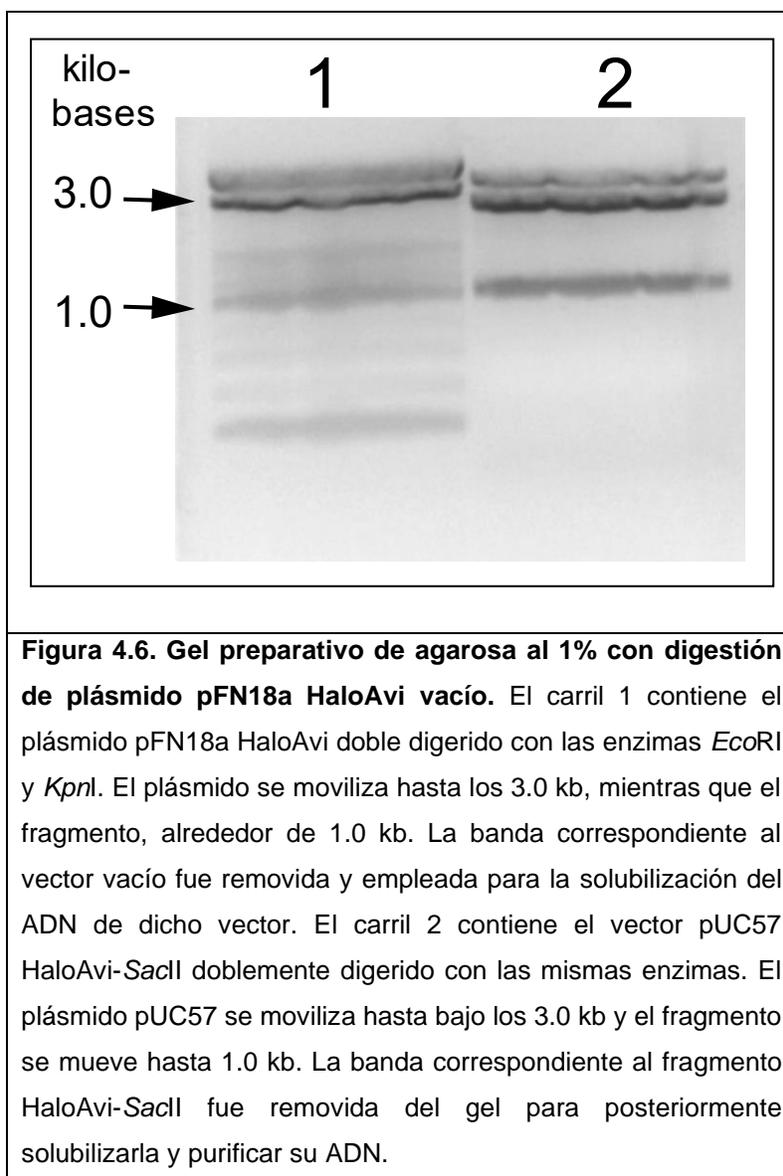


Figura 4.5. Implementación de un vector para inmovilización de proteínas con clonamiento facilitado. A) Plásmido pFN18a HaloAvi desarrollado con sitios de restricción *Eco*RI y *Kpn*I que flanquean los HaloAvi-Tags. Este vector solo permite clonamiento por medio del uso no orientado sitios *Bam*HI y *Bgl*II. B) Plásmido pFN18a vacío cortado con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Kpn*I, los cuales flanquean el marco abierto de lectura ingenierizado. C) Vector pFN18a resultante que incluye los sitios de restricción *Bam*HI y *Sac*II para un clonamiento orientado. El fragmento en rojo esquematiza un gen de interés, el cual puede ser clonado de manera orientada aumentando la tasa de éxito durante el clonamiento.

Este fragmento, el cual incluía un nuevo sitio *Sac*II estaba clonado en el vector pUC57, desde donde se liberó por medio de las enzimas *Eco*RI y *Kpn*I. El fragmento liberado HaloTag-*Sac*II-AviTag se trasladó y clonó en el vector pFN18a previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (**Figura 4.5**) y pUC57-HaloAvi-*Sac*II, para luego realizar una doble digestión con las enzimas *Eco*RI y *Kpn*I. Ambas digestiones fueron cargadas en geles de agarosa, para separar los fragmentos resultantes. De la digestión de pFN18a-HaloAvi se purificó la fracción correspondiente al plásmido vacío (**Figura 4.6**), mientras que de la digestión de pUC57-HaloAvi-*Sac*II se purificó el fragmento optimizado (**Figura 4.7**).



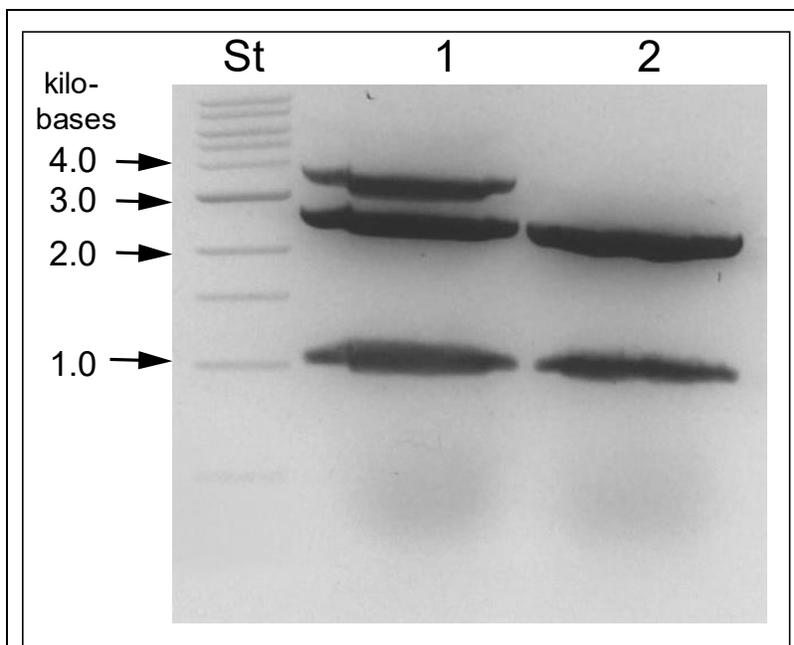


Figura 4.7. Gel preparativo de agarosa al 1% para la digestión del plásmido pUC57 HaloAvi-SacII. Ambos carriles contienen el plásmido pUC57 digerido. El plásmido tiene alrededor de 2710 kb (~3.0 kb), mientras que el fragmento HaloAvi-SacII posee cerca de 1 kb. La banda ubicada cerca de los 4 kb en el carril 1, corresponde a la porción de plásmido que no alcanzó a digerirse. Las bandas correspondientes al fragmento HaloAvi-SacII fueron removidas para posteriormente purificar su ADN.

Posterior a la purificación del plásmido pFN18a y el fragmento HaloAvi-SacII, ambos predigeridos con las enzimas *EcoRI* y *KpnI*, se realizó un ensayo de ligación reconstituyendo un vector pFN18a-HaloAvi *BamHI*-SacII, el que fue purificado. Para confirmar la correcta inserción del fragmento en el plásmido, se seleccionaron ocho clones y se realizó una digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacII* para la liberación de un inserto de distinto peso molecular que el fragmento HaloAvi, para luego visualizarlos a través de un gel de agarosa (**Figura 4.8**).

De los ocho clones digeridos y visualizados, se seleccionaron cuatro para confirmarlos por medio de secuenciación, verificando si la secuencia nucleotídica obtenida de la ligación es la correcta comparada con lo diseñado. Los resultados obtenidos de la secuenciación dieron cuenta que el fragmento enviado por el proveedor fue mal elaborado y no contenía la secuencia exacta solicitada, ya que carecía del sitio de restricción *SacII*. Además, los sitios de restricción resultantes de la ligación de los fragmentos no resultan ser los esperados, debido a las diferencias entre las secuencias restantes en los extremos de estos.

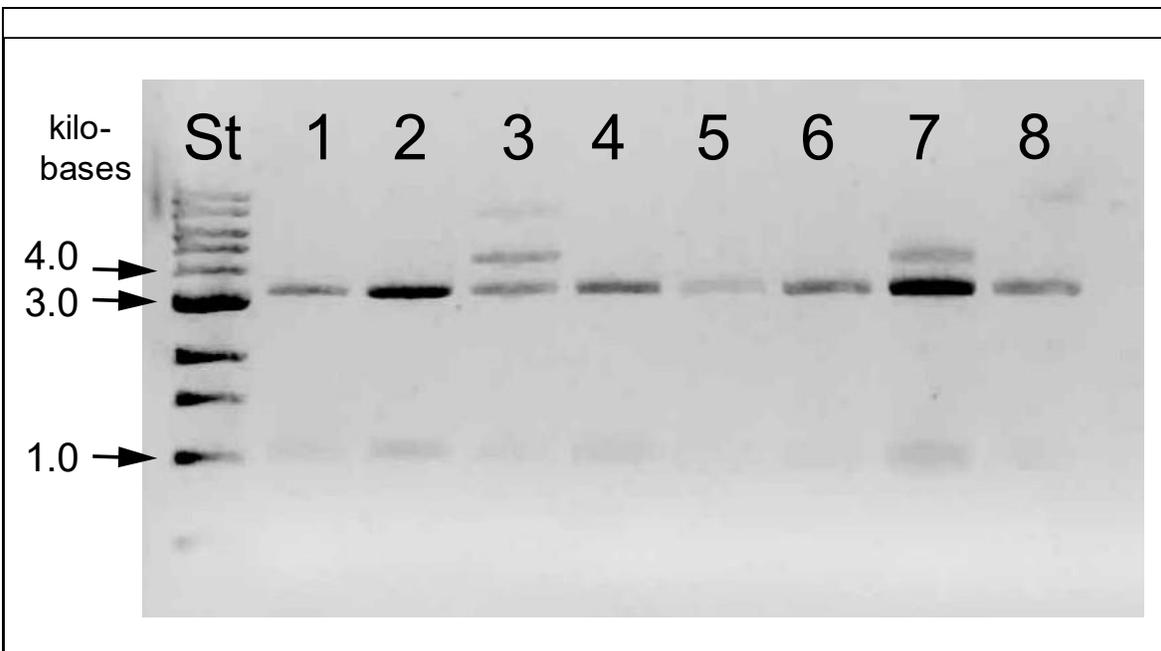
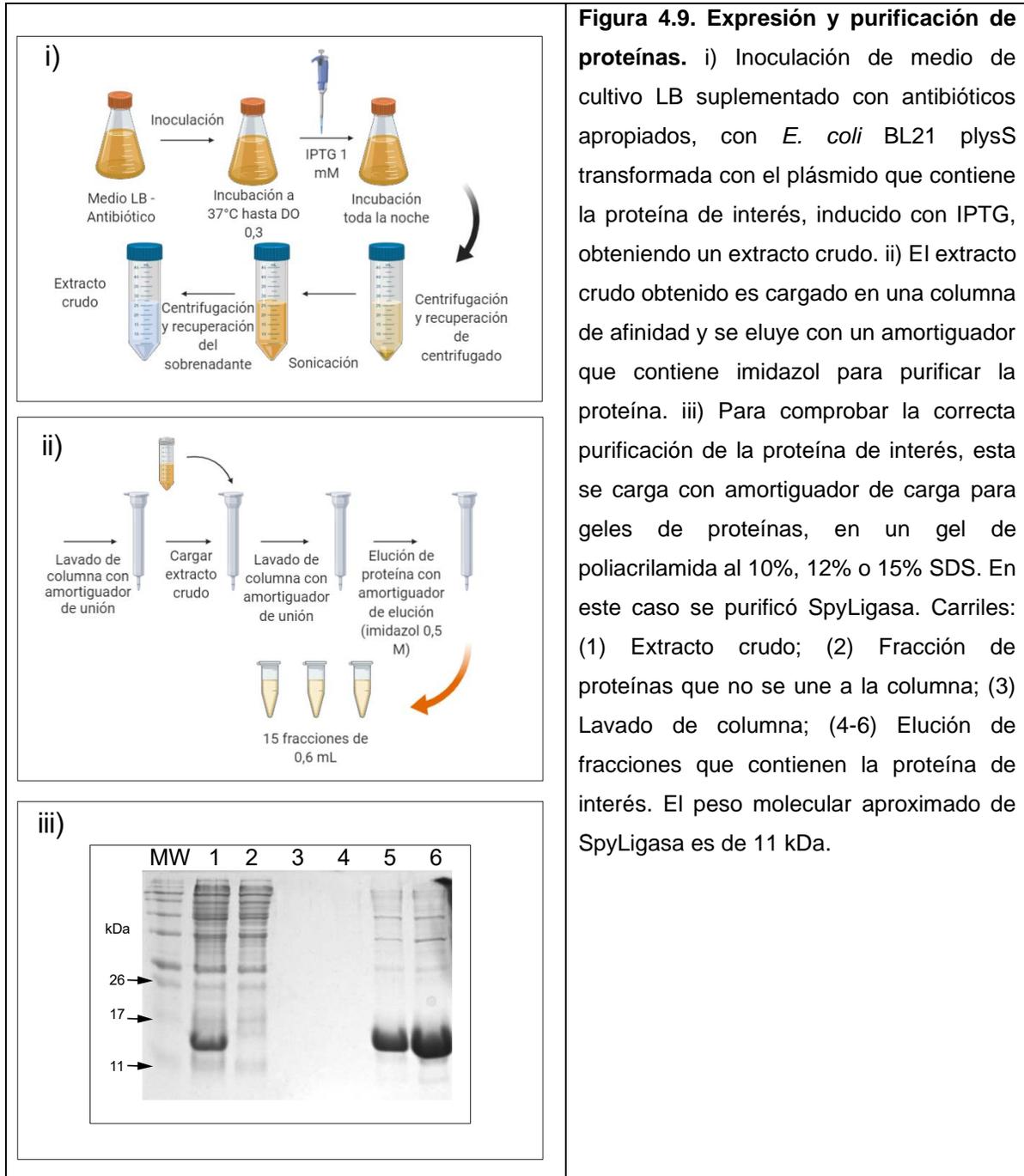


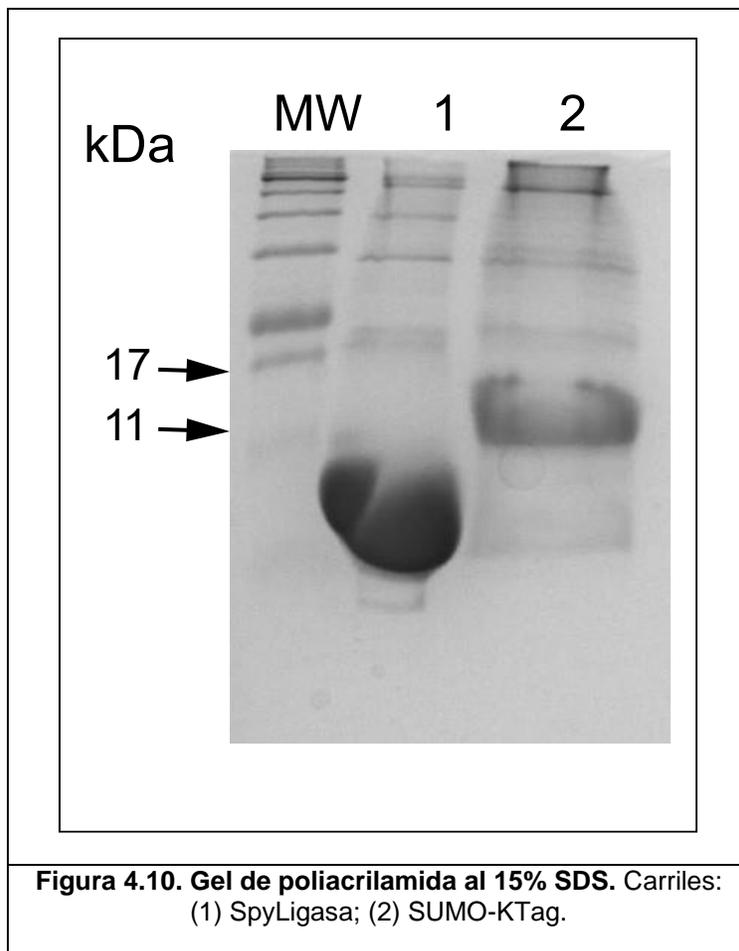
Figura 4.8. Gel analítico de agarosa al 1% con digestión de plásmido pFN18a HaloAvi *Bam*HI-*Sac*II con enzimas de restricción *Eco*RI y *Sac*II para verificación de clonamiento de inserto. La verificación fue a través de la liberación de un inserto digerido por las enzimas mencionadas, quedando un fragmento de alrededor de 3 kb y otro de cerca de 1 kb. El plásmido fue purificado desde ocho clones, de los cuales se seleccionaron cuatro para su secuenciación (carriles 1, 2, 4 y 6).

4.2 Objetivo 2: Expresión de proteínas tag

Con el fin de inmovilizar proteínas y posteriormente polimerizarlas, se purificó un set de proteínas diseñadas y empleadas para polimerización como lo son las implicadas en los sistemas SpyTag-SpyCatcher, SpyLigasa y también se purificó una proteína que serviría como prueba de concepto como HaloTag-TIGK (glucoquinasa de *Thermococcus litoralis*). En la **Figura 4.9** se puede observar el paso a paso de la expresión y purificación que se llevó a cabo en el presente trabajo para cada proteína estudiada. En el caso de dicha figura, se purificó la proteína SpyLigasa.

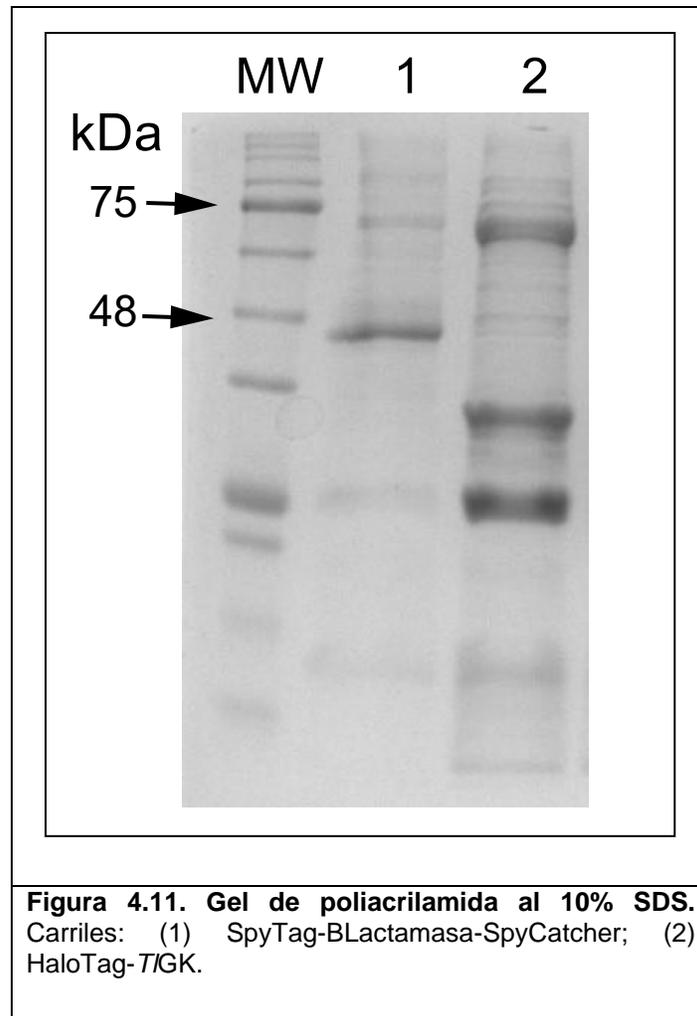


En la **Figura 4.10**, se puede observar un gel 15% SDS en el cual se cargaron las proteínas previamente purificadas SpyLigasa y SUMO-KTag, las cuales poseen un peso molecular aproximado de 11 kDa y 13,7 kDa respectivamente (Fierer et al., 2014). Lo anterior se puede comprobar al comparar sus migraciones con el estándar de peso molecular empleado (MW).



En la **Figura 4.11**, se puede observar un gel 10% SDS en el cual se visualizan las proteínas previamente purificadas SpyTag-BLA-SpyCatcher y HaloTag-TIGK, las cuales migran según sus respectivos pesos moleculares aproximados: 45,7 kDa y 90 kDa respectivamente (Los et al., 2008; Schoene et al., 2014; Wilson, 2011), comparados con el marcador de peso molecular (MW). Cabe mencionar que los pesos moleculares estimados por el proveedor sirven solo de referencia y pueden diferir de los pesos reales, ya que el gel utilizado por este es en gradiente de concentración, y no corresponde al experimento realizado. Además, se observa que en el carril 2, donde se encuentra la enzima HaloTag-TIGK se observan dos bandas bajo la proteína, las cuales podrían ser contaminación. Estas bandas fueron visualizadas en purificaciones y geles anteriores, por lo que podría ser conveniente someter la muestra a una nueva técnica de purificación para la obtención de una mayor pureza en el caso de que el experimento así lo amerite. En el caso de las experiencias

propuestas en este trabajo, inmovilización en sistema de superficies funcionalizadas, la presencia de proteínas contaminantes no son una gran complicación debido a que la inmovilización está basada en la química HaloTag.



Estas proteínas fueron purificadas con el fin de polimerizarlas entre sí de forma que SpyLigasa catalice una ligación péptido-péptido entre la proteína que posee KTag (SUMO-KTag) con la que contiene SpyCatcher (SpyTag-BLactamasa-SpyCatcher), uniendo dos proteínas distintas entre sí y formando una nueva arquitectura proteica. Por otro lado, SpyTag-BLactamasa-SpyCatcher se autopolimerizaría, ya que SpyTag y SpyCatcher reaccionan entre sí formando un enlace covalente resultando una proteína cíclica, y además podría formar distintas formas de oligómeros.

4.4 Funcionalización de superficies e inmovilización de HaloTag-GFP

Para estudiar el funcionamiento de la química de inmovilización de HaloTag, se funcionalizaron con el ligando de cloroalcano dos tipos de superficies: vidrios y cantiléveres. La **Figura 4.12** ilustra el paso a paso de la química implicada en la funcionalización de superficies descrita en la sección 3.4, además de la inmovilización de la proteína HaloTag-GFP utilizada en este experimento como proteína control reportera, descrito en la sección 3.5.

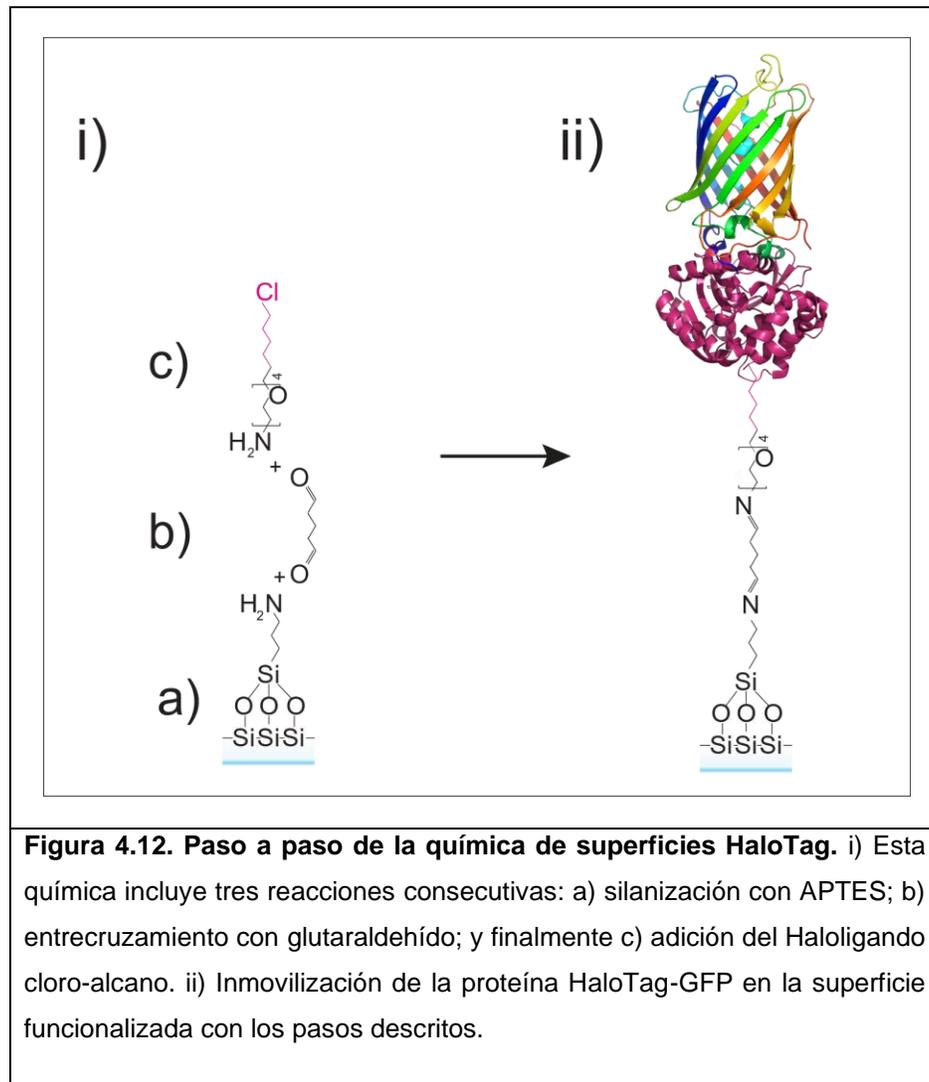


Figura 4.12. Paso a paso de la química de superficies HaloTag. i) Esta química incluye tres reacciones consecutivas: a) silanización con APTES; b) entrecruzamiento con glutaraldehído; y finalmente c) adición del Haloligando cloro-alcano. ii) Inmovilización de la proteína HaloTag-GFP en la superficie funcionalizada con los pasos descritos.

En la **Figura 4.13** se aprecia en el panel i) el sistema de inmovilización de la proteína HaloTag-GFP sobre la punta de un cantiléver, donde la luz absorbida por la proteína se refleja de color verde fluorescente. Dicha proteína contiene un cromóforo llamado p-hidroxibenzilideneimidazolinona que le otorga dos picos de excitación: el primero a los 395 nm y el segundo de 475 nm (Franco & Longart, 2009). Cuando la proteína es excitada a 475 nm, su pico de emisión ocurrirá a 503 nm, por lo que si la proteína es irradiada con luz visible en el rango del azul, ésta será reemitida pero en el rango verde

(Franco & Longart, 2009). Entonces, es relativamente sencillo emplear GFP considerando tanto el equipamiento disponible en el laboratorio, como su eficacia reportera al evaluar inmovilización sobre vidrios y cantiléveres.

Para visualizar la proteína GFP inmovilizada en la punta de un cantiléver, el cual es una superficie casi microscópica y difícil de distinguir para el ojo humano, se utilizó la técnica TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence, o fluorescencia de reflexión interna total) a una longitud de onda de 495 nm, técnica óptica que proporciona la excitación de fluoróforos en una región axial extremadamente delgada. Este método se basa en el principio de que cuando la luz de excitación se refleja en su totalidad internamente en un sólido transparente en su interfaz con un líquido, lo que genera un campo electromagnético llamado onda evanescente en el líquido en la interfaz sólido-líquido, la cual posee la misma frecuencia que la luz de excitación. Debido a que la intensidad de la onda evanescente decae exponencialmente con la distancia desde la superficie del sólido, solo las moléculas fluorescentes dentro de unos pocos cientos de nanómetros del sólido se excitan eficientemente (Fish, 2009). Es por lo anterior que en el panel ii) se observa una imagen limpia y sin ruido de la punta de cantiléver, reflejando la luz verde que caracteriza la proteína GFP.

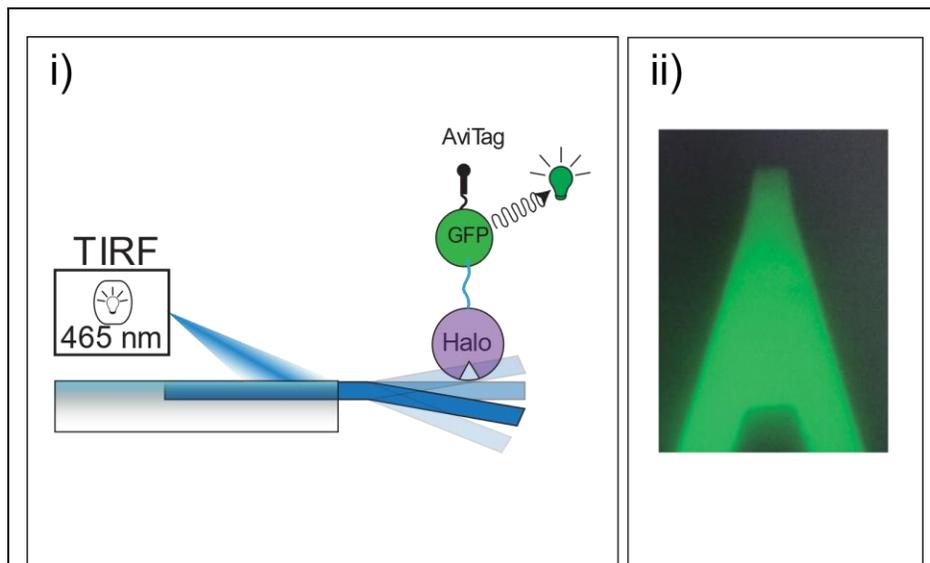


Figura 4.13. Inmovilización de proteína control reportera HaloTag-GFP en cantiléver funcionalizado con Halo-ligando. i) Caricatura donde se aprecia el sistema de inmovilización de la proteína HaloTag-GFP a un cantilever. ii) Cantilever con la proteína HaloTag-GFP inmovilizada.

En la **Figura 4.14** se aprecia la proteína HaloTag-GFP inmovilizada sobre vidrios (panel i) y luego el resultado luego de un tratamiento con la enzima TEV (panel ii). En el segundo panel se observa la ausencia del color verde proveniente de la emisión de GFP, ya que esta proteína se escinde debido que su secuencia incluye un sitio TEV ubicado entre el HaloTag y la proteína (HaloTag-TEV-GFP). Entonces empleando la enzima del mismo nombre, se puede cortar y perder la comunicación con el vidrio, comprobándose así que la proteína reportera permanecía inmovilizada exitosamente en la superficie del vidrio a través de la química de HaloTag.

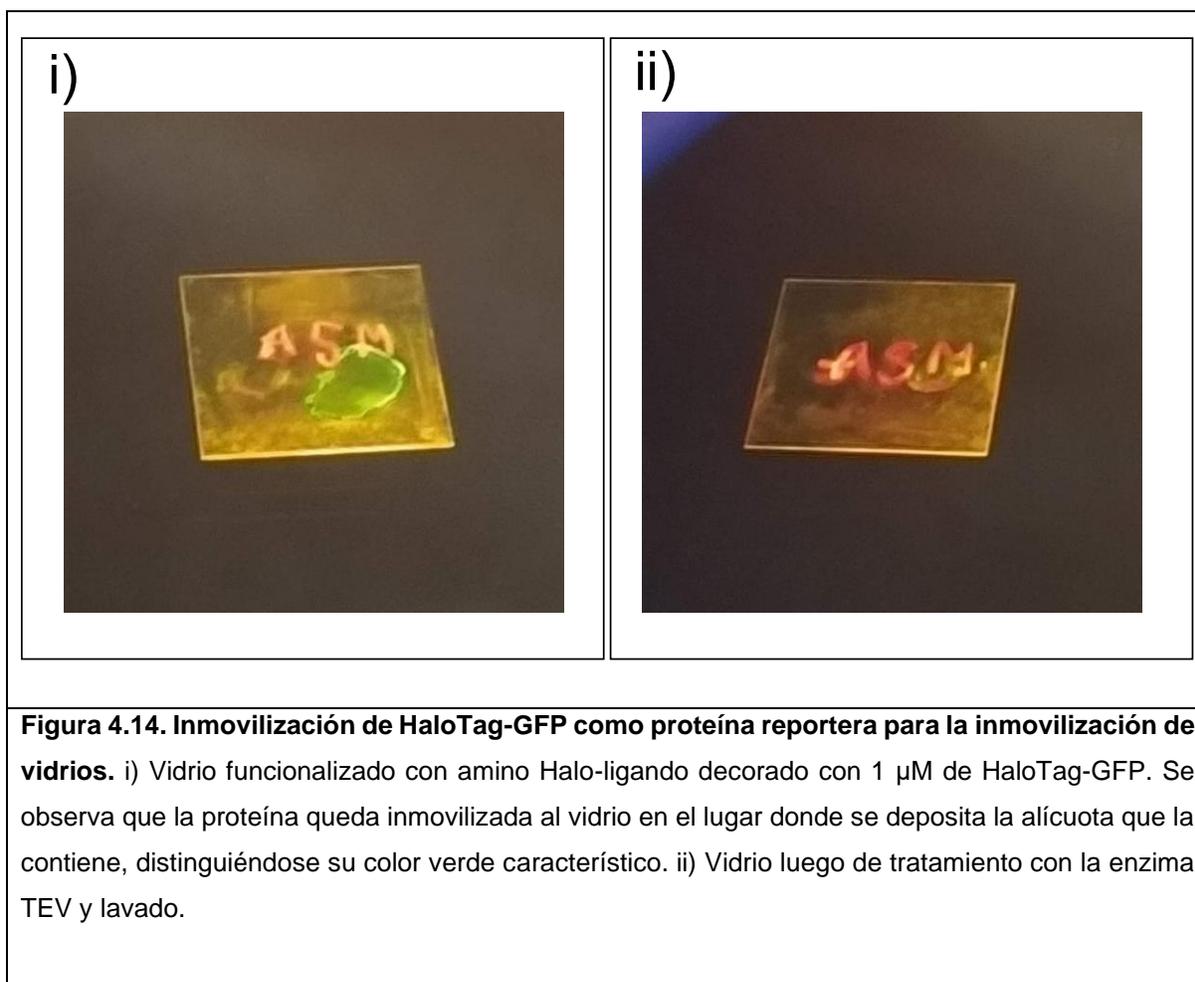


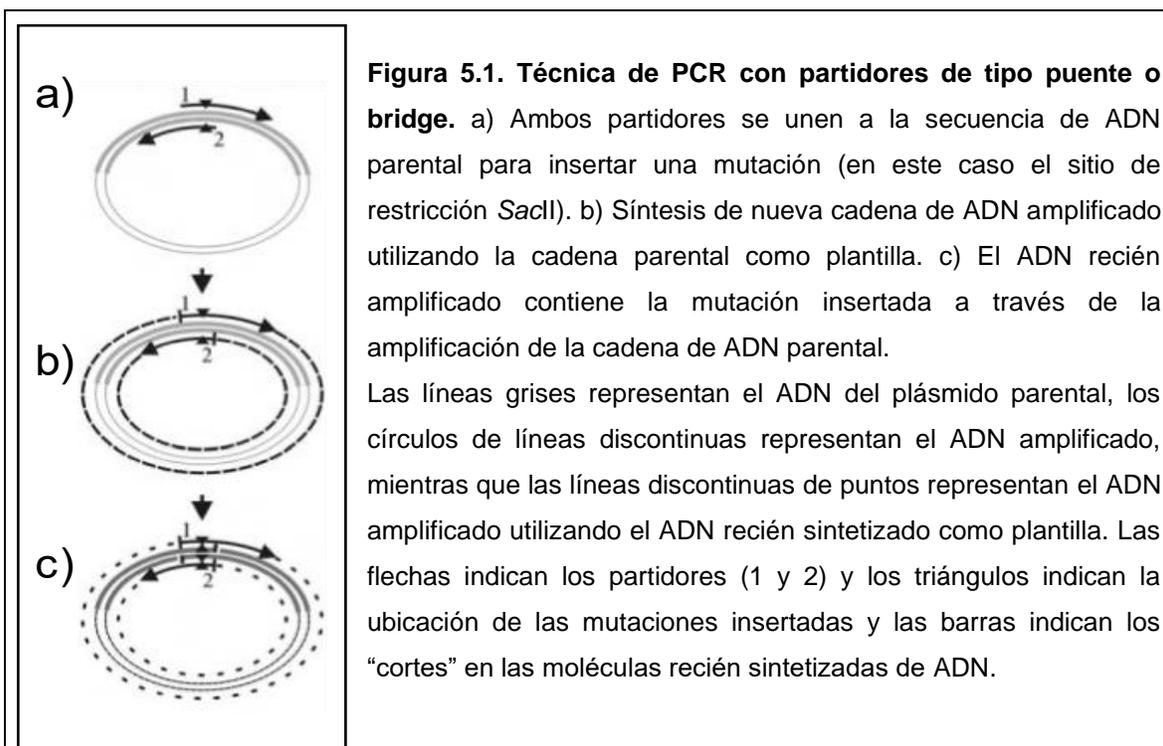
Figura 4.14. Inmovilización de HaloTag-GFP como proteína reportera para la inmovilización de vidrios. i) Vidrio funcionalizado con amino Halo-ligando decorado con 1 μ M de HaloTag-GFP. Se observa que la proteína queda inmovilizada al vidrio en el lugar donde se deposita la alícuota que la contiene, distinguiéndose su color verde característico. ii) Vidrio luego de tratamiento con la enzima TEV y lavado.

5. Proyecciones

Objetivo 1

Este objetivo pretende seguir realizándose apenas se pueda continuar con las actividades normales, cambiando la estrategia de inserción del sitio de restricción *SacII*.

Dentro de las posibles nuevas estrategias para el clonamiento del sitio de restricción mencionado se encuentran los protocolos de Gibson (A Synthetic Genomic Inc., s. f.), PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con partidores de tipo puente o *bridge* (H. Liu & Naismith, 2008) o también podría aplicarse una técnica más sofisticada como CRISPR/Cas9 (Jiang & Doudna, 2017). La técnica que se ha escogido para continuar con el trabajo está basada en PCR con partidores de tipo puente, donde la reacción se lleva a cabo utilizando dos partidores que poseen la mutación a clonar y además son complementarios entre sí, y al unirse a la secuencia molde se replica el ADN plasmidial con dicha mutación (H. Liu & Naismith, 2008). Los extremos de estos partidores son protuberantes para sitios de restricción que ya se encuentran en la secuencia del plásmido a modificar, por lo que la mutación, se introduce entre los sitios de restricción que se prefiera. El resultado será un plásmido donde se podrá clonar de manera orientada una enzima de interés que podrá expresarse e inmovilizarse en superficies sólidas. La construcción de la plataforma de inmovilización pretende seguir llevándose a cabo durante 2020, dado que ya hemos adquirido los partidores a utilizar con la estrategia descrita. Se ha planeado continuar con este trabajo, luego de reanudadas las actividades presenciales.



Objetivo 2

Se logró expresar y purificar de manera exitosa y correcta las proteínas que permiten anclaje. Lamentablemente, no se alcanzó a realizar la inmovilización sobre superficies utilizando las tecnologías SpyCatcher y SpyLigasa. Esto último se realizará durante 2020 ya que se cuentan todas las piezas para continuar con la polimerización de proteínas: SpyTag-BLactamasa-SpyCatcher, SUMO-KTag y SpyLigasa. Las técnicas de polimerización estudiadas en este trabajo poseen gran potencial y son una estrategia alternativa a HaloTag y AviTag para inmovilizar proteínas sobre fases o superficies inmóviles, además de formar nuevas estructuras proteicas y oligómeros de una misma proteína.

Objetivo 3

Durante el desarrollo de este trabajo se logró exitosamente expresar y purificar una proteína que contiene HaloTag (HaloTag-*TIGK*) e inmovilizar una proteína reportera utilizada como control en vidrios y cantiléveres funcionalizados con Halo-ligando (HaloTag-GFP). Se planea realizar inmovilización de enzimas utilizando la misma tecnología en microesferas paramagnéticas, con el objetivo de realizar una prueba de concepto y catalizar una reacción con la enzima HaloTag-*TIGK*, recuperando el producto, la enzima y el soporte de inmovilización para la posterior reutilización de este. La inmovilización de enzimas se puede realizar mediante HaloTag o AviTag, dos técnicas ortogonales, que pueden emplearse de la misma manera para inmovilizar enzimas, extrapolándose a la industria para inmovilizar enzimas que catalicen reacciones de interés industrial.

6. Conclusiones

En este trabajo se diseñó una estrategia para obtener un plásmido que permitiera la clonación de un gen de interés de manera orientada, que permitiera su expresión y posterior inmovilización, con el fin de inmovilizar proteínas o enzimas de interés industrial, permitiendo la recuperación de la enzima y el producto, además de la reutilización de las bolas paramagnéticas empleadas como soporte físico. La estrategia empleada si bien no permitió clonar de manera apropiada la enzima *TIGK*, no dio los resultados esperados en cuanto a la optimización para un clonamiento facilitado y orientado. Los resultados obtenidos muestran que no fue posible insertar el sitio de restricción *SacII*, por lo que no fue posible desarrollar completamente el objetivo inicialmente planteado. Se está trabajando para cambiar la estrategia de clonamiento a PCR utilizando partidores de tipo puente o *bridge* (**Figura 5.1**), los cuales ya fueron adquiridos y se espera lograr terminar de desarrollar la plataforma de biología molecular para inmovilización.

Se logró la correcta purificación de las proteínas que contienen anclas que permiten la inmovilización y polimerización de proteínas como *SpyLigasa* y *SpyTag-SpyCatcher*, además de la proteína etiquetada con el péptido *HaloTag*, *HaloTag-TIGK*, visualizando estas proteínas y sus respectivas piezas en geles SDS, teniendo así todas las piezas necesarias para el siguiente paso, la polimerización de proteínas. Estos péptidos que permiten anclaje son una alternativa a *HaloTag* o *AviTag* para la inmovilización de proteínas en superficies sólidas, adquiriendo así gran potencial para ser desarrolladas en el ámbito de inmovilización enzimática.

Se inmovilizó exitosamente una proteína reportera control que contiene el péptido *HaloTag* (*HaloTag-GFP*) sobre vidrios y cantiléveres funcionalizados con el *Halo*-ligando, mas no se alcanzó a realizar inmovilización de alguna enzima de interés industrial en bolas paramagnéticas. Este experimento se realiza con el fin de catalizar una reacción donde pueda recuperarse fácilmente el producto, además de poder reutilizar el soporte físico, lo cual sería un gran aporte a la industria de enzimas, ya que estaría implicado un mayor rendimiento y una reducción en los costos de producción.

La construcción de la plataforma para la inmovilización de enzimas de interés industrial, la polimerización de proteínas y el ensayo de inmovilización sobre bolas paramagnéticas se llevará a cabo durante 2020 apenas se puedan continuar con actividades normales, completando así todos los objetivos contemplados al comienzo de esta Tesis (segundo semestre de 2019), los cuales no pudieron completarse a cabalidad debido al estallido social y la actual pandemia.

7. Bibliografía

- A Synthetic Genomic Inc. (s. f.). *Gibson Assembly Cloning Guide, 2nd Edition*.
https://www.biocat.com/bc/files/Gibson_Guide_V2_101417_web_version_8.5_x_11_FINAL.pdf
- Arnold, F. H. (2018). Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(16), 4143–4148. <https://doi.org/10.1002/anie.201708408>
- Arroyo, D. M. (1998). *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. 17.
- AviTag™ Technology, protein biotinylation | Genecopoeia. (s. f.). Recuperado 22 de marzo de 2020, de <https://www.genecopoeia.com/tech/avitag-biotinylation-tag/>
- Bernal, C., Rodríguez, K., & Martínez, R. (2018). Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts. *Biotechnology Advances*, 36(5), 1470–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.06.002>
- Buldun, C. M., Jean, J. X., Bedford, M. R., & Howarth, M. (2018). SnoopLigase Catalyzes Peptide–Peptide Locking and Enables Solid-Phase Conjugate Isolation. *Journal of the American Chemical Society*, 140(8), 3008–3018. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13237>
- Cacicedo, M. L., Manzo, R. M., Municoy, S., Bonazza, H. L., Islan, G. A., Desimone, M., Bellino, M., Mammarella, E. J., & Castro, G. R. (2019). Chapter 7—Immobilized Enzymes and Their Applications. En R. S. Singh, R. R. Singhania, A. Pandey, & C. Larroche (Eds.), *Advances in Enzyme Technology* (pp. 169–200). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00007-8>
- Carrion-Vazquez, M., Oberhauser, A. F., Fowler, S. B., Marszalek, P. E., Broedel, S. E., Clarke, J., & Fernandez, J. M. (1999). Mechanical and chemical unfolding of a single protein: A comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3694–3699. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3694>

- Chivers, C. E., Koner, A. L., Lowe, E. D., & Howarth, M. (2011). How the biotin–streptavidin interaction was made even stronger: Investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochemical Journal*, 435(1), 55–63. <https://doi.org/10.1042/BJ20101593>
- Choi, J.-M., Han, S.-S., & Kim, H.-S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1443–1454. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
- Contreras, F., & Rivas-Pardo, J. (2020). Interfering with the Folding of Group A Streptococcal pili Proteins. En *Group A Streptococcus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (En Prensa, Vol. 2136).
- Fierer, J. O., Veggiani, G., & Howarth, M. (2014). SpyLigase peptide–peptide ligation polymerizes affibodies to enhance magnetic cancer cell capture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(13), E1176–E1181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315776111>
- Fish, K. N. (2009). Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.]*, 0 12, Unit12.18. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1218s50>
- Franco, A. Y., & Longart, M. (2009). Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1, 14.
- Illanes, A., Cauerhff, A., Wilson, L., & Castro, G. (2013). Recent trends in biocatalysis engineering. En *Bioresource Technology* (Vol. 115).
- Ito, S., Fushinobu, S., Yoshioka, I., Koga, S., Matsuzawa, H., & Wakagi, T. (2001). Structural basis for the ADP-specificity of a novel glucokinase from a hyperthermophilic archaeon. *Structure (London, England: 1993)*, 9(3), 205–214. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(01\)00577-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00577-9)
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46(1), 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Li, L., Fierer, J. O., Rapoport, T. A., & Howarth, M. (2014). Structural Analysis and Optimization of the Covalent Association between SpyCatcher and a Peptide Tag. *Journal of molecular biology*, 426(2), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.021>

- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Liu, H., & Naismith, J. H. (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnology*, 8, 91. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-91>
- Liu, L., Yang, H., Shin, H., Chen, R. R., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2013). How to achieve high-level expression of microbial enzymes. *Bioengineered*, 4(4), 212–223. <https://doi.org/10.4161/bioe.24761>
- Los, G. V., Al Darzins, Chad Zimprich, Natasha Karassina, Randall Learish, Mark G. McDougall, Lance P. Encell, Rachel Friedman-Ohana, Monika Wood, Gediminas Vidugiris, Kris Zimmerman, Paul Otto, Dieter H. Klaubert, & Keith Wood. (2005). *HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology for Cell Imaging, Protein Capture and Immobilization*. 89, 5.
- Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M. G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klaubert, D. H., Bulleit, R. F., & Wood, K. V. (2008). HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chemical Biology*, 3(6), 373–382. <https://doi.org/10.1021/cb800025k>
- Los, G. V., & Wood, K. (2007). The HaloTag: A novel technology for cell imaging and protein analysis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 356, 195–208. <https://doi.org/10.1385/1-59745-217-3:195>
- Motejaded, H., Kranz, B., Berensmeier, S., Franzreb, M., & Altenbuchner, J. (2010). Expression, One-Step Purification, and Immobilization of HaloTag™ Fusion Proteins on Chloroalkane-Functionalized Magnetic Beads. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162, 2098–2110. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8985-1>

- Murata, H., Carmali, S., Baker, S. L., Matyjaszewski, K., & Russell, A. J. (2018). Solid-phase synthesis of protein-polymers on reversible immobilization supports. *Nature Communications*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03153-8>
- Rivas-Pardo, J. A., Herrera-Morande, A., Castro-Fernandez, V., Fernandez, F. J., Vega, M. C., & Guixé, V. (2013). Crystal Structure, SAXS and Kinetic Mechanism of Hyperthermophilic ADP-Dependent Glucokinase from *Thermococcus litoralis* Reveal a Conserved Mechanism for Catalysis. *PLoS ONE*, *8*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066687>
- Schmidt-Dannert, C., & Arnold, F. H. (1999). Directed evolution of industrial enzymes. *Trends in Biotechnology*, *17*(4), 135–136. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01283-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01283-9)
- Schoene, C., Fierer, J. O., Bennett, S. P., & Howarth, M. (2014). SpyTag/SpyCatcher Cyclization Confers Resilience to Boiling on a Mesophilic Enzyme. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, *53*(24), 6101–6104. <https://doi.org/10.1002/anie.201402519>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, *6*(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Veggiani, G., Nakamura, T., Brenner, M. D., Gayet, R. V., Yan, J., Robinson, C. V., & Howarth, M. (2016). Programmable polyproteins built using twin peptide superglues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(5), 1202–1207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519214113>
- Wilson, C. (2011). *SINGLE MOLECULE STUDIES BY OPTICAL TWEEZERS: FOLDING AND UNFOLDING OF GLUCOKINASE FROM Thermococcus litoralis*. Universidad de Chile.
- Wong, J., Chilkoti, A., & Moy, V. T. (1999). Direct force measurements of the streptavidin–biotin interaction. *Biomolecular Engineering*, *16*(1), 45–55. [https://doi.org/10.1016/S1050-3862\(99\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S1050-3862(99)00035-2)
- Wong, T. S., Zhurina, D., & Schwaneberg, U. (2006). The Diversity Challenge in Directed Protein Evolution. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, *9*, 271–288. <https://doi.org/10.2174/138620706776843192>
- Zakeri, B., Fierer, J. O., Celik, E., Chittock, E. C., Schwarz-Linek, U., Moy, V. T., & Howarth, M. (2012). Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a

bacterial adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), E690-697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115485109>