

**Universidad Nacional Autónoma De México  
Instituto De Biotecnología  
Departamento De Ingeniería Celular y Biocatálisis**

**EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE UNA MALATO  
DESHIDROGENASA CON ACTIVIDAD DE LACTATO  
DESHIDROGENASA EN *Escherichia coli***

**Tesis que para obtener el título de Maestro en Ciencias**

**Presenta**

**René Jesús Porraz Mercado**

**Director de tesis: Dr. Joel Osuna Quintero**

Cuernavaca, Morelos

Marzo 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y la Virgen por iluminar mi camino a lo largo de este recorrido

A mis padres y hermano por el apoyo incondicional que siempre me han prestado

A Margot Von Lindemann, Yolanda Peregrino y Margot Cruet por su generosa hospitalidad durante mi estancia en Cuernavaca

Al Dr Joel Osuna Quintero por sus enseñanzas y apoyo y por su excelente dirección de este proyecto

Al Comité Tutorial: Dr Joel Osuna Quintero, Dr Lorenzo Segovia Forcella y Dr Alfredo Martínez Jiménez por sus valiosas recomendaciones en el desarrollo del presente trabajo

A los sinodales: Dr Guillermo Gosset Lagarda, Dr Mario Soberón Chávez, Dra Clarita Olvera Carranza, Dr Daniel Genaro Segura González y Dr Joaquín Cordero Martínez por sus atinadas recomendaciones en la elaboración de este manuscrito

A la Dra Consuelo Vázquez Limón, Dr Humberto Flores Soto, Ing. Ana Lilia Tirado Chamu, M.C. Maria Getzabet Gonzalez Gutierrez e IBQ Alejandra Aquino Infante por el apoyo técnico y académico proporcionado durante los experimentos realizados a lo largo de este proyecto

A todos mis amigos/as con los que siempre pude confiar y que hicieron mi estancia en Cuernavaca más placentera

Al Instituto de Biotecnología por facilitarme lo necesario para el desarrollo de este proyecto

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr Joel Osuna Quintero en el Departamento de Ingeniería celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología bajo su dirección

## CONTENIDO

Resumen.....	1
Abstract.....	2
I. Introducción.....	3
a) Evolución dirigida de proteínas.....	3
b) Lactato deshidrogenasa.....	7
c) Malato deshidrogenasa.....	10
II. Antecedentes.....	12
III. Hipótesis.....	13
IV. Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	14
V. Materiales y métodos.....	15
a) Evolución dirigida de la MDH quintuple mutante.....	15
b) Ensayos de actividad enzimática.....	16
c) Transformación en vector pTrc99-A.....	19
d) Purificación de proteínas.....	22
e) Determinación de parámetros catalíticos.....	22
VI. Resultados y discusión.....	23
a) PCR mutagénica.....	24
b) Generación y selección de colonias.....	24
c) Análisis de secuencias.....	28
d) Determinación de posible actividad LDH.....	30
e) Determinación de actividad enzimática.....	33
f) Análisis de estructuras.....	42
VII. Conclusiones.....	50
VIII. Bibliografía.....	52
IX. Apéndice.....	56

## Relación de figuras

1. Rutas fermentativas de <i>Escherichia coli</i> .....	6
2. Reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa.....	8
3. Reacción catalizada por la enzima malato deshidrogenasa.....	11
4. Obtención de variantes.....	18
5. Actividad de controles y variantes en vector pTrc99-A.....	21
6. Colonias de <i>Escherichia coli</i> en anaerobiosis.....	25
7. Curvas de crecimiento bacteriano en anaerobiosis.....	27
8. Secuencias proteicas de controles y variantes.....	29
9. Velocidad enzimática en base al consumo de NADH de controles y variantes.....	32
10. Curvas de actividad enzimática con piruvato y piruvato en presencia de oxalacetato.....	35
11. Curvas de actividad enzimática con oxalacetato.....	38
12. Curvas de actividad enzimática con NADH+H <sup>+</sup> .....	41
13. Sitio activo de la MDH quintuple mutante.....	43
14. Sitio activo de la variante 10482.....	45

15. Sitio activo de la variante 10874.....	46
16. Sitio activo de la variante 10875.....	47

### **Relación de tablas**

1. Tamaño proporcional de las colonias en anaerobiosis.....	26
2. Características de variantes.....	30
3. Consumo de NADH+H <sup>+</sup> .....	31
4. Parámetros catalíticos de variantes con piruvato y piruvato en presencia de oxalacetato.....	34
5. Parámetros catalíticos de variantes con oxalacetato.....	37
6. Parámetros catalíticos de variantes con NADH+H <sup>+</sup> .....	40

### **Abreviaturas más usadas**

ATP – Adenosín trifosfato

LDH – Lactato deshidrogenasa

MDH – Malato deshidrogenasa

NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)

NADH+H<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)

PDC – Piruvato descarboxilasa

PFL – Piruvato formato liasa

## RESUMEN

Las enzimas malato deshidrogenasa (MDH EC 1.1.1.37) y lactato deshidrogenasa (LDH EC 1.1.1.27) presentan una gran semejanza en su estructura terciaria y en su mecanismo de catálisis. La MDH cataliza la reducción de oxalacetato a malato, mientras que la LDH cataliza la reducción de piruvato a lactato; ambas enzimas utilizan el NADH como cofactor.

Haciendo uso de un análisis filogenético, Yin y Kirsch (2007) diseñaron una MDH, la cual porta cinco mutaciones, con una actividad de LDH del 0.1%. Nosotros decidimos aplicar una estrategia de evolución dirigida sobre esta mutante, utilizando la cepa Val23 (Lara *et al.* 2006), la cual tiene los genes que codifican para las enzimas LDH y piruvato formato liasa (PFL EC 2.3.1.54) eliminados, lo que imposibilita su crecimiento en anaerobiosis, a menos que se la complemente con una enzima que permita su crecimiento en estas condiciones.

Vázquez-Limón *et al.* (2007) proponen que existe una correlación entre el crecimiento celular en anaerobiosis y la actividad de la enzima responsable de regenerar el cofactor, por lo que decidimos usar el crecimiento celular como método de selección para probar variantes de la MDH con actividad de LDH. Mediante el uso de esta estrategia, conseguimos tres variantes a las cuales se les midieron los parámetros catalíticos. Dichas variantes crecen mejor en anaerobiosis y recuperaron la actividad hacia el oxalacetato, pérdida por la enzima parental; sin embargo, no son capaces de mejorar la actividad hacia piruvato y sólo una de ellas mejora la actividad hacia el cofactor, por lo que estudios posteriores son necesarios para explicar esta mejora en el crecimiento celular.

## **ABSTRACT**

The enzymes malate dehydrogenase (MDH EC 1.1.1.37) and lactate dehydrogenase (LDH EC 1.1.1.27) are similar in its tertiary structure and catalysis mechanism. MDH catalyses the reduction from oxalacetate to malate, while LDH catalyses the reduction from piruvate to lactate; both enzymes used NADH as cofactor.

Using a phylogenetic analysis, Yin y Kirsch (2007) designed a MDH bearing five mutations, with LDH activity of 0.1%. We decided to applied a directed evolution strategy on this mutant, using Val23 strain (Lara *et al.* 2006) which has deleted the genes that codified to the enzymes LDH and piruvate formate lyase (PFL EC 2.3.1.54), making it impossible its anaerobic growth, unless it is complemented with another enzyme that allows its growth in such conditions.

Vázquez-Limón *et al.* (2007) proposed that exists a correlation between cell's anaerobic growth and the activity of the enzyme responsible to regenerate the cofactor, so we decided the cellular growth as a selection method to test variants of MDH with LDH activity. Through this strategy, we obtained three variants to which the catalytic parameters were measured. Such variants has a better growth in anaerobiosis and restored the activity to oxalacetate, which loses the parental enzyme; however, they are not to improve the activity to piruvate and only one is capable de improve the activity to the cofactor, so later studies are required to explain such improvement in the cellular growth.

## **I. INTRODUCCION**

### **a) Evolución Dirigida De Proteínas**

Las proteínas desempeñan un papel fundamental en todas las funciones bioquímicas de la célula, y el papel de cada una de ellas se encuentra en función de la secuencia de aminoácidos que la constituyen, así como de la forma en que se pliegan en el espacio. De esta manera, si se quiere conseguir una proteína con actividades de interés industrial, es muy conveniente conocer la relación estructura función de dicha proteína para mejorar o modificar sus propiedades, para de esa manera introducir mutaciones específicas en la secuencia de aminoácidos, en un enfoque conocido como diseño racional (Soberón y Montero, 2004).

Desafortunadamente, no contamos a la fecha con la información suficiente para predecir el cambio en la estructura tridimensional de una proteína, al modificar su secuencia de aminoácidos. Desde la década de 1970, ha surgido una estrategia alterna para producir variantes de interés de una proteína dada (Campbell et al. 1973). Dicho enfoque consiste simplemente en tratar de imitar el proceso de selección natural, al introducir variabilidad en la secuencia nucleotídica del gen que codifica para una proteína y seleccionar aquellas variantes de interés para su posterior propagación en un proceso cíclico repetido tantas veces como sea necesario. Esta estrategia ha sido usada con éxito en la modificación de una amplia variedad de proteínas, dentro de las que se cuentan principalmente

enzimas (Giver *et al.* 1998, Reetz, 2004), proteínas reporteras (Kiss *et al.* 2009) y anticuerpos (Jung *et al.* 1999).

Este planteamiento propone principalmente dos retos: 1) la necesidad de generar la mayor diversidad posible en las variantes producidas y 2) estrategias que permitan una selección eficaz de las mismas.

Respecto al primer punto, existen principalmente dos enfoques: uno consiste en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles) pero utilizando una enzima que sea propensa a introducir un cierto número de errores en la secuencia nucleotídica, en una técnica conocida como epPCR, mientras que otra técnica, conocida como “DNA shuffling” consiste en la recombinación de alelos con mutaciones puntuales, para permitir la recombinación y fijación de mutaciones benéficas para el organismo (Stemmer, 1994). Otras variantes de estas técnicas han surgido en los últimos años (Lutz & Patrick, 2004).

Un método eficaz de elección de variantes de una proteína dada depende en gran medida de las propiedades que se quieran estudiar (Arnold *et al.* 2001). En muchos casos, métodos de selección en los que las propiedades de la proteína de interés están acopladas al crecimiento y supervivencia celular, pueden ser de gran utilidad al estudiar enzimas cuya función es crucial en un proceso biológico determinado (Merz, 2000).

En el caso específico de la evolución dirigida de enzimas involucradas en el metabolismo fermentativo (Figura 1), se ha encontrado que en mutantes incapaces de crecer en condiciones anaeróbicas, cualquier ruta metabólica que restaure el equilibrio redox, restituye además la capacidad de la célula de crecer en anaerobiosis (Boernke *et al.* 1995). Basados en este hecho se ha propuesto

que la velocidad de crecimiento celular está en función de la regeneración del  $\text{NAD}^+$ , al participar en la generación de ATP por el catabolismo de la glucosa (Vázquez-Limón *et al.* 2007). Para comprobar esto se utilizó la cepa Val23, la cual se construyó a partir de la cepa W3110 de *Escherichia coli*, y en la cual los genes que codifican para las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato formato liasa (PFL) fueron reemplazadas por una versión truncada de cada una de ellas (Lara *et al.* 2006). Esta cepa fue complementada con los genes que codifican para la piruvato descarboxilasa (pdc) y la alcohol deshidrogenasa (adh) de *Zymomonas mobilis*, involucradas ambas en la fermentación alcohólica, lo que permitió restaurar el crecimiento en anaerobiosis. La velocidad en el crecimiento correlacionaba además con un aumento en el consumo de la glucosa, lo que causaba un mayor flujo de carbono hacia la regeneración del  $\text{NAD}^+$  (Vázquez-Limón *et al.* 2007).

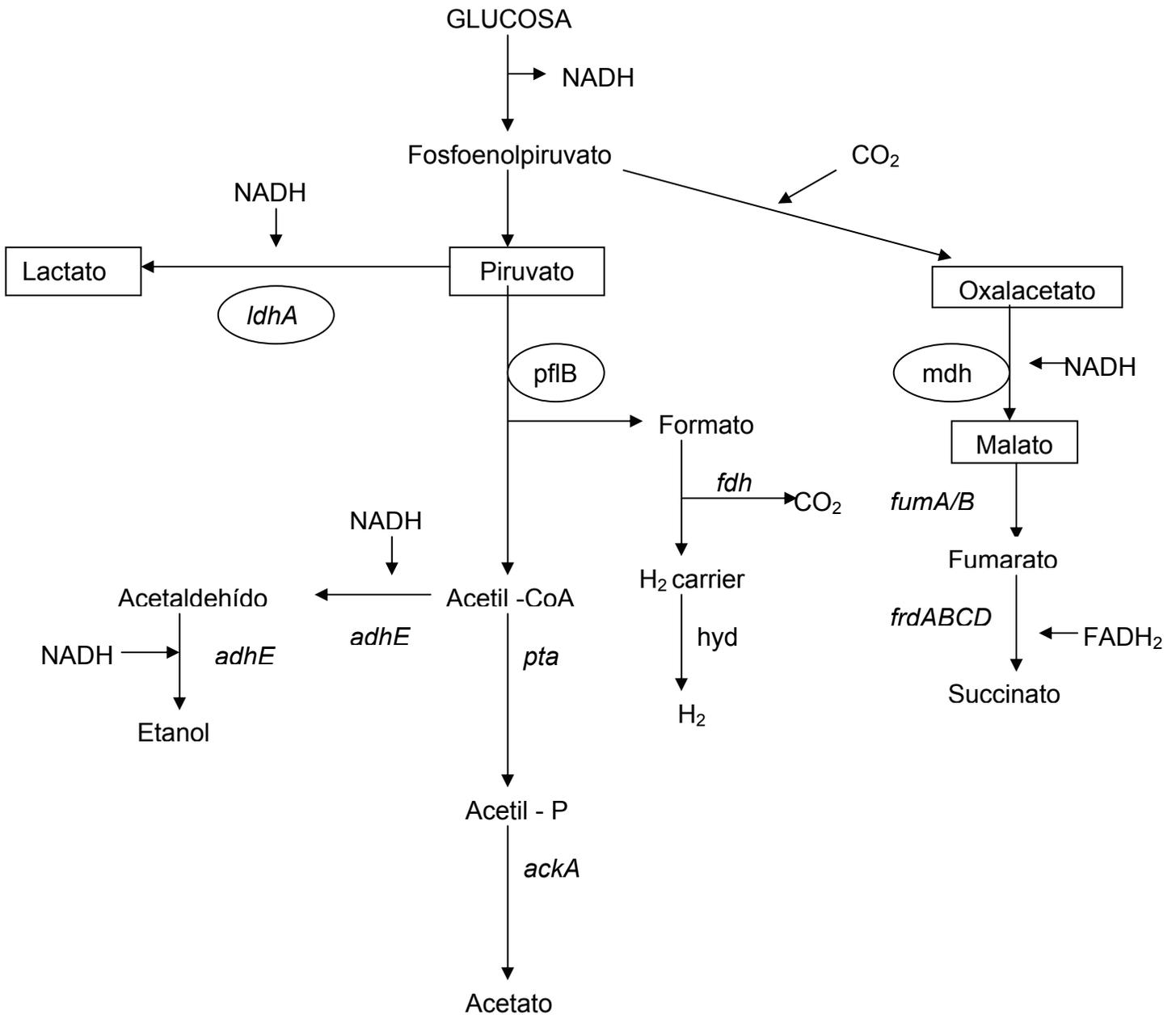


Figura 1. Rutas fermentativas de *Escherichia coli*. Abreviaturas: *ackA* (acetato cinasa), *adhE* (alcohol deshidrogenasa), *fdh* (formato deshidrogenasa), *frdABCD* (fumarato reductasa), *fumA/B* (fumarasa A y B), *pf1B* (piruvato formato liasa), *pta* (fosfotransacetilasa). Se muestran encerrados en cuadrado los metabolitos con los que se trabajo en este estudio y en círculo los genes que codifican para las enzimas estudiadas.

## b) Lactato Deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH EC 1.1.1.27) cataliza una reacción de óxido reducción, en la que el piruvato producto de la glucólisis es reducido a lactato, y que usa como cofactor nicotinamida adenosin dinucleótido, NADH, el cual es oxidado a  $\text{NAD}^+$  en el proceso (Figura 2). El lactato producido puede presentar dos formas isoméricas, D-LDH y L-LDH, dependiendo de la enzima que cataliza la reacción. Alternativamente, también puede catalizar otras reacciones, tal como la conversión de fenilpiruvato a fenillactato (Jia *et al.* 2010).

Estas enzimas presentan diferencias en su mecanismo de activación: la enzima que produce el L-lactato es activada por la fructosa-1,6-bisfosfato, mientras que la enzima responsable de la formación del D-lactato presenta una activación alostérica por piruvato (Tarmy & Kaplan, 1968). El L-lactato se produce en lactobacilos (Mayr *et al.* 1982) y en *Bacillus subtilis* (Yoshida, 1965), en tanto que la producción de D-lactato se ha estudiado en *Escherichia coli* (Bunch *et al.* 1997). Otros estudios hechos en esta bacteria demuestran que la proporción de síntesis de lactato se incrementa conforme los niveles intracelulares de piruvato aumentan (Yang *et al.* 2001). Por otra parte, otros estudios apuntan a la inhibición de la reacción por exceso de sustrato, producto de la formación de un complejo abortivo entre la enzima, el  $\text{NAD}^+$  y el piruvato; mediante la sustitución de un residuo de ácido aspártico por un residuo de arginina en la posición 38, en *Bacillus stearothermophilus*, se logró disminuir la afinidad de la enzima por el  $\text{NAD}^+$ , y por consiguiente, la formación del complejo abortivo anteriormente mencionado se vió reducida (Binay y Karaguler, 2007). Otros estudios hechos en *Escherichia coli*,

demuestran que la LDH se activa en condiciones de anaerobiosis y acidez (Bunch *et al.* 1997).

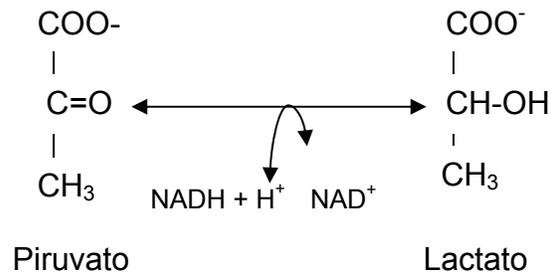


Figura 2. Reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

Dos clases de fuentes de carbono pueden ser utilizadas para la producción de lactato: carbohidratos en su forma pura, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, etc. o productos vegetales que contengan dichos carbohidratos, los cuales pueden ser bagazo de caña de azúcar o yuca, o productos almidonados obtenidos a partir de papa, trigo, zanahoria, cebada, entre otros (Pandey *et al.* 2001). Esta segunda opción parece ser económicamente más viable, dado que el proceso de sacarificación puede ser omitido (Yumoto e Ikeda, 1995).

Mientras que algunos microorganismos producen principalmente lactato en su proceso fermentativo, por lo que son llamados homofermentativos (Mayr *et al.* 1982), otros producen lactato, junto con una variedad de otros compuestos, tales como acetato, succinato, formato y etanol, recibiendo estos microorganismos la denominación de heterofermentativos, tal como es el caso de *Escherichia coli* (Clark, 1989)

A pesar de que la naturaleza homofermentativa de los lactobacilos, los convierte en una opción viable para la producción de lactato, la complejidad de los componentes que requieren para su crecimiento, no hacen rentable su utilización industrial (Hofvendal y Hahn-Hagerdal, 2000). También se han hecho algunos intentos por generar cepas de levaduras productoras de lactato mediante la interrupción de la piruvato descarboxilasa, involucrada en la vía de fermentación alcohólica, la cual compite por el piruvato con la LDH al ser ésta expresada en levaduras, obteniéndose productividades de L-lactato de 103.3 g/L en 33 horas en *Candida utilis* (Ikushima *et al.* 2009) y 85.9 g/L en 48 horas en *Candida boidinii* (Osawa *et al.* 2009).

Un reto importante en la generación de cepas productoras de lactato es tratar de disminuir la producción de acetato, el cual parece ser el principal producto de la fermentación en *Escherichia coli*, y que representa una disminución en la producción de la proteína recombinante de interés, dado que la producción de acetato disminuye el flujo de carbono hacia síntesis de biomasa o generación de energía (Doelle *et al.* 1981). De hecho, aún aumentando la expresión de lactato deshidrogenasa, la mayor parte del flujo energético es usado para la producción de acetato (Yang *et al.* 1999).

El uso de cepas modificadas de *Escherichia coli* ha mostrado tener excelentes resultados al obtener D-lactato ópticamente puro. En ese sentido, Utrilla *et al.* (2009) mediante la inactivación de la enzima piruvato formato liasa (PFL EC 2.3.1.54), la cual se encuentra involucrada en la producción de acetil-CoA, un intermediario del acetato, han generado una cepa de *Escherichia coli* llamada CL3, la cual presenta un aumento en el consumo de glucosa y producción de D-

lactato. Por otra parte, Zhou *et al.* (2003), mediante mutaciones en la piruvato formato liasa (pflB), la alcohol deshidrogenasa (adhE), la acetato cinasa (ackA) y la fumarato reductasa (frdBC) han logrado crear una cepa en *Escherichia coli* con rendimientos de D-lactato 40% superiores a la cepa silvestre W3110 y la cual requiere solamente sales minerales como nutrientes, siendo nombrada esta cepa SZ63.

Teniendo como objetivo generar una variante con mayor capacidad de crecimiento gracias a una mayor capacidad de regeneración de NADH, Prachyasittikul *et al.* (2006) realizaron una fusión traduccional de los genes que codifican para las enzimas lactato deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* y galactosa deshidrogenasa de *Pseudomonas fluorescens* resultando en una enzima quimérica con mayor capacidad de regenerar el cofactor y con valores de Km similares a las enzimas nativas. Dicho aumento en la capacidad de regenerar el cofactor puede ser debido a la unión transitoria de los sitios activos de ambas enzimas, lo que crea una estructura que facilita la catálisis.

### **c) Malato Deshidrogenasa**

Dentro del grupo de las óxido-reductasas, se encuentra también la malato deshidrogenasa (MDH EC 1.1.1.37), la cual cataliza la oxidación del malato a oxalacetato en un proceso reversible, utilizando como cofactor el  $\text{NAD}^+$ , el cual es reducido a NADH, durante el ciclo de Krebs. En el metabolismo fermentativo ocurre la reacción contraria, siendo el oxalacetato reducido a malato, y el NADH

oxidado a  $\text{NAD}^+$  (Figura 3), participando esta enzima en la vía de síntesis de succinato.

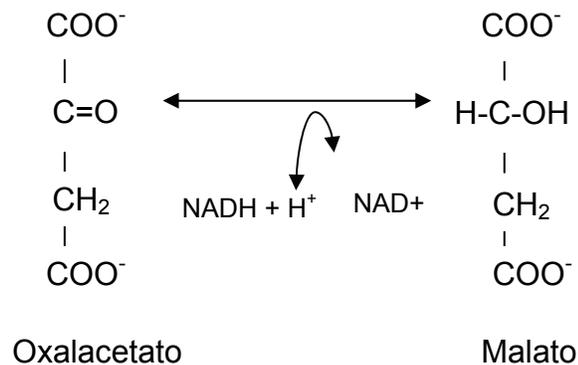


Figura 3. Reacción catalizada por la enzima malato deshidrogenasa (MDH)

Cabe mencionar que el oxalacetato desempeña un papel importante en muchas rutas metabólicas, además del ciclo de Krebs, tales como la síntesis de aminoácidos, la gluconeogénesis y el ciclo del glioxilato (Goward y Nicholls, 1994). La MDH es una enzima multimérica, que consiste de dos o cuatro subunidades idénticas con un peso molecular de aproximadamente 35 kDA (Sundaram *et al.* 1980), funcionando el sitio activo de cada subunidad de forma independiente (McEvily *et al.* 1985). Se ha encontrado que en presencia de acetato y en condiciones de aerobiosis, la actividad de MDH aumenta significativamente, pero disminuye drásticamente en condiciones de anaerobiosis, observándose también una disminución en la capacidad de generar ATP a partir de la fermentación de la glucosa en una cepa doble mutante *ldhA<sup>-</sup> pflB<sup>-</sup>*, lo cual demuestra que las actividades anapleróticas, que proporcionan el sustrato para otras enzimas que

regeneran el NADH, tal como es el caso en la reducción del oxalacetato, son demasiado bajas para tener un impacto importante en el crecimiento celular (Wu *et al.* 2007).

## II. ANTECEDENTES

A pesar de que la LDH y la MDH presentan una limitada identidad de secuencias, existe una gran similitud tanto a nivel secundario como terciario de ambas proteínas (Barstow *et al.* 1986). Esto aunado a un mecanismo de catalisis similar (Clarke *et al.* 1986, Goward y Nicholls, 1994) ha impulsado a varios investigadores ha estudiar un posible cambio en la afinidad de sustrato de una enzima utilizando estas dos proteínas como modelo.

En este sentido, una sustitución sencilla de glutamina a arginina en el residuo 102 (Q102R) de la LDH de *Bacillus stearothermophilus*, confirió a ésta mayor afinidad por el oxalacetato, y por tanto, una mayor actividad de la MDH (Wilks *et al.* 1988). Sin embargo, el experimento contrario, en el que se sustituyó la arginina por una glutamina en el residuo 81 (R81Q) de la MDH de *Escherichia coli*, resultó solamente en una disminución del grado de especificidad por el oxalacetato (Nicholls *et al.* 1992). Con el objeto de crear una MDH con actividad LDH, Yin y Kirsch (2007) diseñaron una mutante en base a alineamientos de MDHs y LDHs de diferentes organismos. Aquellas mutaciones que se conservaban en forma diferente en MDHs y LDHs fueron elegidas y añadidas mediante mutagenesis dirigida. Dichas mutaciones son las siguientes: I12V, R81Q, M85E, G210A, V214I. La MDH quintuple mutante presenta una actividad de LDH aproximadamente del 0.1%, comparada con la enzima LDH silvestre de *Escherichia coli* y aumenta 28

veces la afinidad por el piruvato sobre el oxalacetato, difiriendo de la mutante sencilla R81Q la cual aumenta 2 veces la afinidad por el oxalacetato sobre el piruvato. Al graficar la velocidad de reacción de esta mutante, en función de la concentración de piruvato, se obtiene una hipérbola rectangular característica de una enzima que presenta una cinética de Michaelis-Menten (Yin y Kirsch, 2007). Cabe destacar que 2 de estas mutaciones son aditivas, ya que las cuádruples mutantes R81Q/G210A/V214I+I12V y +M85E incrementan la actividad LDH de la enzima por 2.6 y 5 veces respectivamente, mientras que la quintuple mutante presenta un incremento de 13 veces la actividad LDH.

En el presente trabajo, hemos decidido aplicar la estrategia de evolución dirigida a la MDH quintuple mutante, con el objeto de conferirle mayor actividad tipo lactato deshidrogenasa, usando como método de selección la velocidad de crecimiento celular, con base a lo propuesto por Vázquez-Limón *et al.* (2007), siendo las colonias seleccionadas aquellas que presentaban un mayor crecimiento en anaerobiosis.

### **III. HIPOTESIS**

El uso del sistema de selección propuesto por Vázquez-Limón *et al.* (2007), el cual propone que la velocidad del crecimiento celular en anaerobiosis está directamente relacionada con la actividad de la enzima responsable de regenerar el  $\text{NAD}^+$ , junto con la evolución dirigida, en una variante quintuple mutante de la MDH, permitirá obtener una lactato deshidrogenasa eficiente.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Obtener variantes de la enzima malato deshidrogenasa mediante evolución dirigida que puedan realizar la conversión de piruvato a lactato con mayor eficiencia que la MDH quintuple mutante diseñada por Yin y Kirsch (2007).

##### **Objetivos Especificos**

- a) Generar un banco de variantes de *Escherichia coli* que presenten mutaciones en la enzima malato deshidrogenasa quintuple mutante.
- b) Utilizar el método de selección propuesto por Vázquez-Limón *et al.* (2007) que permita distinguir entre aquellas variantes con actividad tipo lactato deshidrogenasa de las que no presentan dicha actividad en condiciones de anaerobiosis, el cual propone que la velocidad de crecimiento celular en anaerobiosis es proporcional a la actividad de la enzima responsable de regenerar el cofactor. De esta manera podemos distinguir entre aquellas variantes con actividad tipo lactato deshidrogenasa de las que no presentan dicha actividad en condiciones de anaerobiosis.
- c) Obtener la secuencia nucleotídica de las variantes que presenten actividad tipo lactato deshidrogenasa.
- d) Comprobar el incremento de la posible actividad tipo lactato deshidrogenasa, mediante la cuantificación de la desaparición de NADH en presencia de piruvato.
- e) Modelar las mutaciones generadas en la estructura de la enzima malato deshidrogenasa

## V. MATERIALES Y METODOS

### a) Evolución Dirigida De La Malato Deshidrogenasa Quintuple Mutante

El plásmido pT4-MDHwt fue diseñado utilizando el gene MDH de *Escherichia coli*, el cual fue amplificado por PCR y clonado en un vector pT4Bla, el cual porta un gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección (Osuna *et al.*). Mediante ciclos sucesivos de PCR, se construyó el plásmido pT4-MDHquintuple. Utilizando una reacción de PCR mutagénica al azar se introdujeron mutaciones en la secuencia de MDH clonada en este último vector.

Con el fin de demostrar la actividad de LDH de las variantes generadas por evolución dirigida, se empleó una cepa de *Escherichia coli*, llamada Val23, la cual presenta las secuencias que codifican para los genes de la lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato formato liasa (PFL) truncadas, por lo que su crecimiento en anaerobiosis se ve seriamente comprometido, al no ser capaz de regenerar el  $\text{NAD}^+$  necesario para la síntesis de ATP (Lara *et al.* 2006).

A partir de células de dicha cepa, se generaron células electrocompetentes, las cuales fueron transformadas con el banco obtenido por PCR mutagénica y sembradas en cajas Petri con medio Luria-Broth (LB) con glucosa (2 g/L) y carbonato de sodio (4 g/L) más kanamicina como marcador de selección. Estas cajas fueron incubadas aproximadamente durante 48 horas en cámaras de anaerobiosis.

Después de este tiempo, se seleccionaban aquellas colonias que presentaban un mayor crecimiento, y se procedió a la purificación del plásmido de la colonia, con el kit comercial Roche, mediante la técnica de lisis alcalina. Los genes modificados fueron secuenciados en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología y estas secuencias fueron comparadas con la secuencia de la MDH quintuple mutante, para encontrar las mutaciones generadas en el proceso de mutagenesis al azar

### **b) Ensayos De Actividad Enzimática**

Se realizaron ensayos de actividad enzimática para determinar la actividad LDH de las variantes obtenidas, mediante la cuantificación de la desaparición del NADH en presencia de diferentes concentraciones de piruvato y se determinó el consumo de NADH+H<sup>+</sup> mediante la ley de Bouger y Beer.

Como controles para realizar estos experimentos se utilizaron células de *Escherichia coli* de la cepa Val23 que portan la malato deshidrogenasa propia de la especie, así como células transformadas con el plásmido pT4Bla que portan una mutación sencilla (R81Q) y mutaciones quintuples (I12V, R81Q, M85E, G210A, V214I) respectivamente (Yin y Kirsch, 2007). Como un control positivo se emplearon células de *Escherichia coli* que portan la enzima lactato deshidrogenasa propia de la especie transformadas con el plásmido pTrc99-LDH.

A partir de cultivos líquidos en medio Luria Broth mas kanamicina, excepto las células transformadas con el plásmido pTrc-99LDH en donde se utilizó ampicilina como marcador de selección, se ajustaron paquetes celulares de cada clona a 4

DO. Dichos paquetes fueron resuspendidos en 300  $\mu\text{l}$  de amortiguador  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M y sonicados durante un ciclo de 25 s. Finalmente se realizaron los ensayos en un espectrofotómetro lector de placas marca Safire de la casa Tecan, en placas de 96 pozos. La absorbancia se midió a 340 nm y se realizaron 30 mediciones en un tiempo de 10 minutos.

Para cada ensayo se utilizaron los siguientes reactivos en el siguiente orden, con un volumen total de 150  $\mu\text{l}$ : amortiguador de fosfatos  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M, NADH 0.15 mM 20  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$  de extracto celular y piruvato 200 mM, del cual se tomó la cantidad adecuada para tener las concentraciones necesarias para cada ensayo y el cual fue el que desencadenó la reacción enzimática.

Las concentraciones de piruvato que se utilizaron para cada ensayo son 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 35 mM y 50 mM.

De la misma manera, se emplearon diferentes concentraciones de oxalacetato para conocer la actividad MDH que todavía conservan aquellas variantes cuya actividad LDH fué mayor al de la MDH quintuple mutante. Las condiciones empleadas fueron las mismas que en las pruebas realizadas con piruvato.

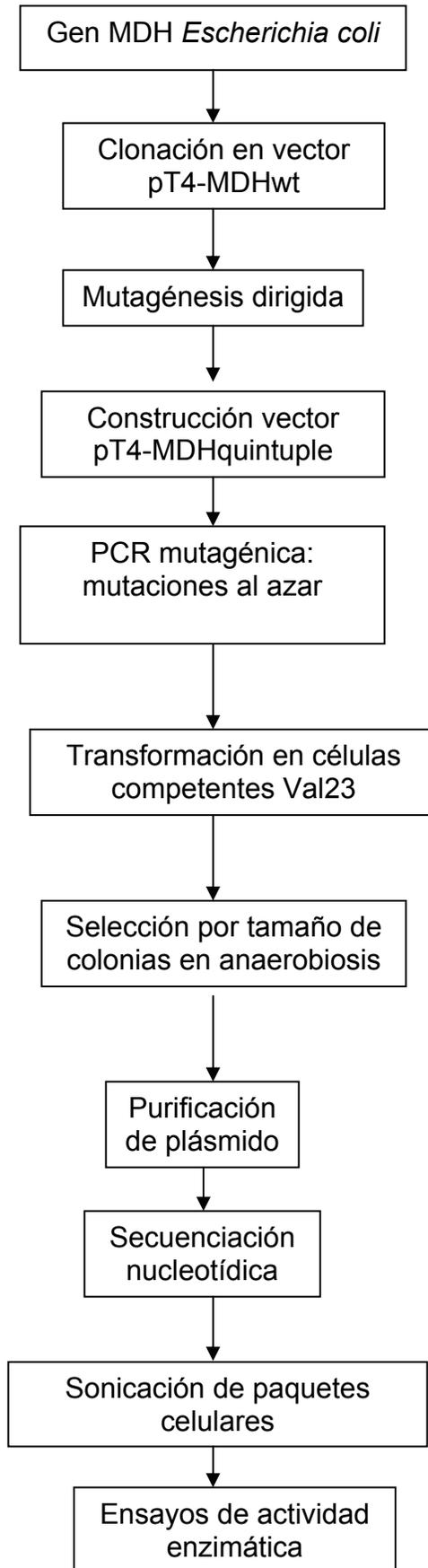


Figura 4. Diagrama de flujo:  
Obtención de variantes

### c) Transformación en vector pTrc99-A

Con el objeto de purificar las proteínas para análisis posteriores decidimos insertar las variantes con mejor actividad LDH, las cuales fueron la 10482, la 10874 y la 10875, así como los respectivos controles, en un vector inducible con mayor nivel de expresión, tal como es el pTrc99-A, el cual presenta como características sobresalientes un promotor fuerte inducible por IPTG, el cual es un híbrido de los promotores de los operones de la lactosa y el triptófano, así como resistencia a ampicilina (Egon *et al.* 1983).

Como primera medida, se amplificaron las secuencias de interés, mediante el uso de los oligos MDHH6Forw (GGGCCGCCCCCATGGCGAAAGTCGCAGTCCTCGG) el cual presentaba un sitio de restricción para la enzima NcoI (subrayado) y MDHH6Back(CCGCCGCCAAAGCTTTTAATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGCT TATTAACGAACTCTTCG) con el sitio de restricción para la enzima HindIII (subrayado) y una secuencia que codifica para una cola de histidinas (en negritas), añadido con el objeto de realizar posteriormente la purificación de las enzimas utilizadas en este trabajo.

Posteriormente se purificaron los productos de PCR obtenidos mediante el uso del kit de purificación Roche y se digirieron mediante el uso de las enzimas de restricción NcoI y HindIII, con el objeto de ligarlas en el vector de clonación pTrc99-A, el cual fue utilizado para transformar células electrocompetentes Val23, las cuales fueron plaqueadas en cajas con medio Luria-Broth (LB) con ampicilina como marcador de selección.

Finalmente, se eligieron colonias al azar para la purificación de los plásmidos, realizado con la ayuda del kit comercial Roche, mediante el uso de la técnica de lisis alcalina, y se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, tras lo cual se compararon las secuencias con el objeto de comprobar que las mutaciones anteriormente encontradas estuvieran presentes, así como la presencia de las colas de histidina.

Con el objeto de inducir la actividad del promotor *trc* en el vector pTrc99A se utilizaron precultivos de las variantes y controles, los cuales fueron puestos a crecer en medio LB con ampicilina como marcador de selección por 8 horas, después de las cuales se pasaron 50  $\mu$ l de cada cultivo a tubos con medio LB e IPTG 0.1 M, con ampicilina como marcador de selección, durante toda la noche. Con estos cultivos se realizaron ensayos de actividad enzimática como los descritos arriba. Con el objeto de comparar la actividad de las variantes y los controles en el vector pTrc99-A con el vector pT4Bla empleado anteriormente se realizaron también ensayos de actividad enzimática en variantes que portaban este último vector; en ambos casos, las concentraciones de piruvato utilizadas fueron: 5, 10 y 25 mM. El procedimiento que se siguió para insertar los controles y las variantes se ilustra en la figura 5.

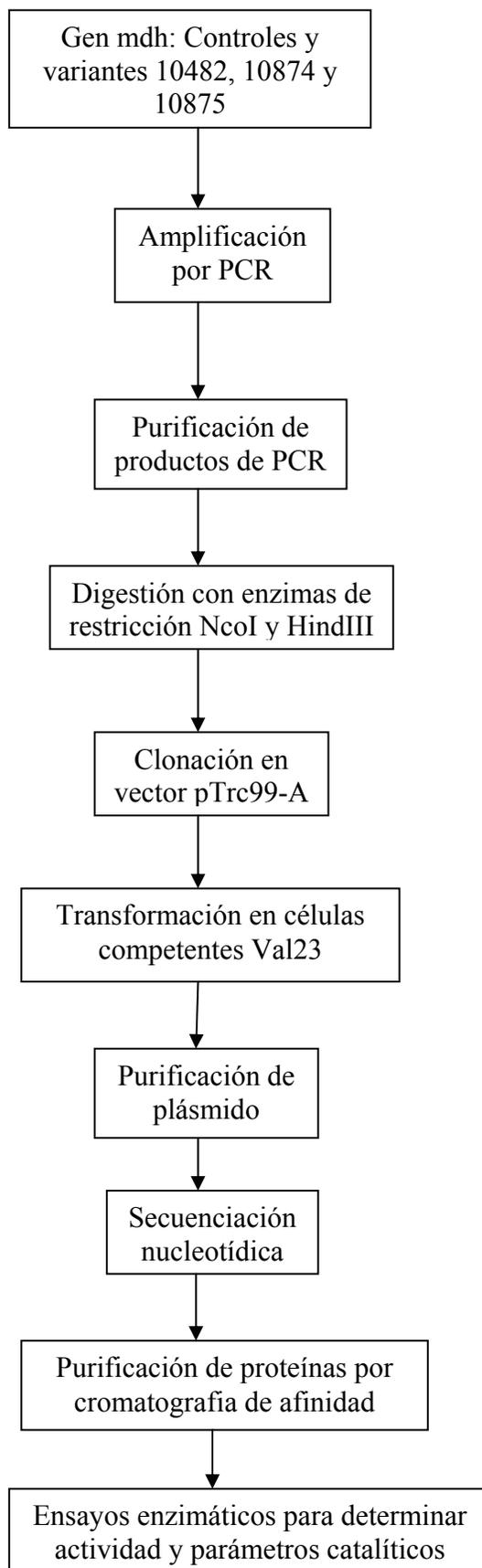


Figura 5. Diagrama de flujo: Actividad de controles y variantes MDH en vector pTrc99-A

#### **d) Purificación de proteínas**

Para determinar los parámetros catalíticos de las variantes 10482, 10874 y 10875, así como de los controles, se procedió a purificar las proteínas mediante una variante de la técnica de cromatografía de afinidad, en el cual las proteínas se unen a níquel añadido previamente mediante las colas de histidina, el cual a su vez se une a una resina de agarosa que contiene ácido nitrilotriacético; las proteínas finalmente son eluidas (Ver apéndice). Después se realizaron ensayos enzimáticos, como los descritos arriba, a diferentes concentraciones de piruvato. La concentración de las proteínas purificadas fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976) y la actividad LDH que presentaron fue medida mediante el mismo tipo de ensayo enzimático que se explica arriba a diferentes concentraciones de piruvato.

#### **e) Determinación de parámetros catalíticos**

Las curvas de actividad enzimática fueron realizadas de la siguiente manera: aquellos minutos en los cuales la enzima se encuentra a máxima velocidad por tener todos sus sitios activos disponibles, fueron graficados y se obtuvo el valor de la pendiente de la recta; todos estos valores fueron graficados a su vez contra la concentración del sustrato empleado. En todos los casos se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford y la cantidad de proteína empleada fue 1  $\mu$ l; todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Utilizando el

programa Kaleidagraph se obtuvo la  $V_{max}$  y la  $K_m$  de la MDH quintuple mutante y de las variantes obtenidas por evolución dirigida en cada condición. Con estos valores fue posible obtener los valores de  $K_{cat}$  y  $K_m$  de cada variante en las diferentes condiciones utilizadas.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Un experimento eficaz de evolución dirigida requiere el desarrollo de una metodología que permita generar la mayor diversidad posible de mutantes y un método de selección que permita discernir entre estas variantes aquellas que poseen las características buscadas. Por lo que respecta al segundo punto, al tratarse de enzimas involucradas en el metabolismo anaerobio un método eficaz de selección puede estar basado en el fenotipo resultante de la actividad de la enzima responsable de la regeneración del  $NAD^+$  (Vázquez-Limón *et al.* 2007). Si se complementa una cepa carente de esta capacidad con una enzima que la restituya, podremos probar la viabilidad de esta última con base en el crecimiento celular que presente la cepa en cuestión.

### **a) PCR Mutagénica**

Mediante la técnica de PCR mutagénica, se obtuvo un banco de variantes a partir de una quintuple mutante de la malato deshidrogenasa (MDH) con escasa actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) (Yin y Kirsch, 2007), el cual fue ligado en el vector de clonación pT4Bla y sembrado en un cultivo líquido de 6 ml de medio Luria-Broth (LB) con kanamicina, con el objeto de conocer el tamaño del banco generado. A partir de éste, se sembró 1  $\mu$ l en una caja de Petri con medio LB sólido con kanamicina, obteniéndose 20 colonias después de 24 horas de crecimiento. De esta manera, el tamaño total del banco es de 120,000 variantes.

### **b) Generación y Selección de Colonias**

El banco de variantes obtenido por PCR mutagénica, se utilizó para transformar células electrocompetentes de *Escherichia coli*, cepa Val23, caracterizada por presentar las secuencias que codifican para la lactato deshidrogenasa (LDH) y la piruvato formato liasa (PFL) inactivadas.

Para demostrar que las variantes obtenidas a partir de la malato deshidrogenasa (MDH) quintuple mutante presentaban una mayor actividad de lactato deshidrogenasa que la clona parental, las células transformadas fueron incubadas en anaerobiosis, de tal manera que solo aquellas colonias capaces de reducir el piruvato a lactato son capaces de crecer, al ser el  $\text{NAD}^+$  regenerado y empleado para la producción de ATP durante la glucólisis.

De acuerdo con esto, aquellas colonias que presentaban un mayor crecimiento podrían presentar una mayor capacidad de regenerar el  $\text{NAD}^+$ , al presentar una mayor actividad de lactato deshidrogenasa. De esta manera, fueron seleccionadas 3 colonias que presentaban un tamaño superior al promedio (Figura 6), de las cuales se purificaron plásmidos y se secuenciaron para compararlas con la clona MDH quintuple mutante parental

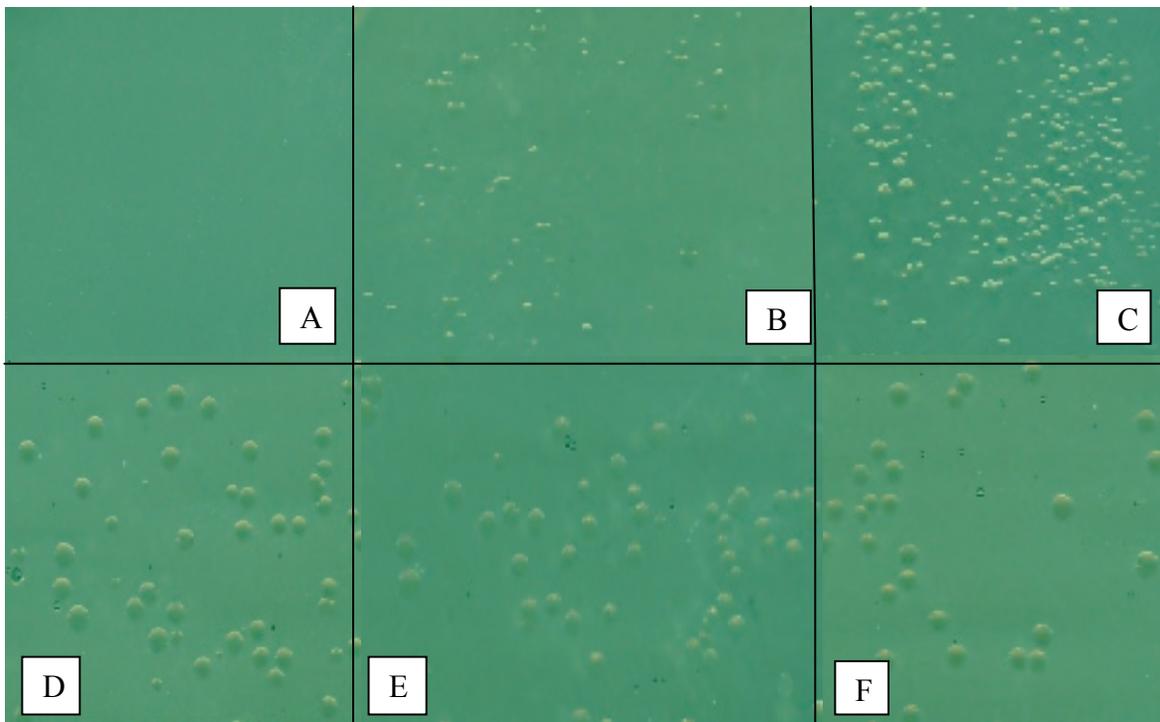


Figura 6. Colonias de *Escherichia coli* en anaerobiosis a las 48 horas de incubación. A. MDH silvestre. B. MDH mutante sencilla. C. MDH mutante quintuple. D. Variante 10482. E. Variante 10874. F. Variante 10875.

En la tabla 1 se muestra la proporción en porcentaje del tamaño de las colonias obtenidas en los cultivos en anaerobiosis tomando como referencia aquella variante que presentó una mejor capacidad de crecimiento

Tabla 1. Tamaño proporcional de las colonias obtenidas durante el cultivo en anaerobiosis.

CLONA	TAMAÑO PROPORCIONAL
MDH silvestre	0%
MDH mutante sencilla	50%
MDH mutante quíntuple	53%
Variante 10482	99%
Variante 10874	100%
Variante 10875	88%

Estos resultados fueron confirmados mediante curvas de crecimiento, obtenidas a partir de cultivos líquidos los cuales fueron gaseados con N<sub>2</sub>, con el objeto de extraer el oxígeno presente y crear así un ambiente anaeróbico. A estos cultivos se les midió la densidad óptica cada hora en un lapso de tiempo de 24 horas (Figura 7).

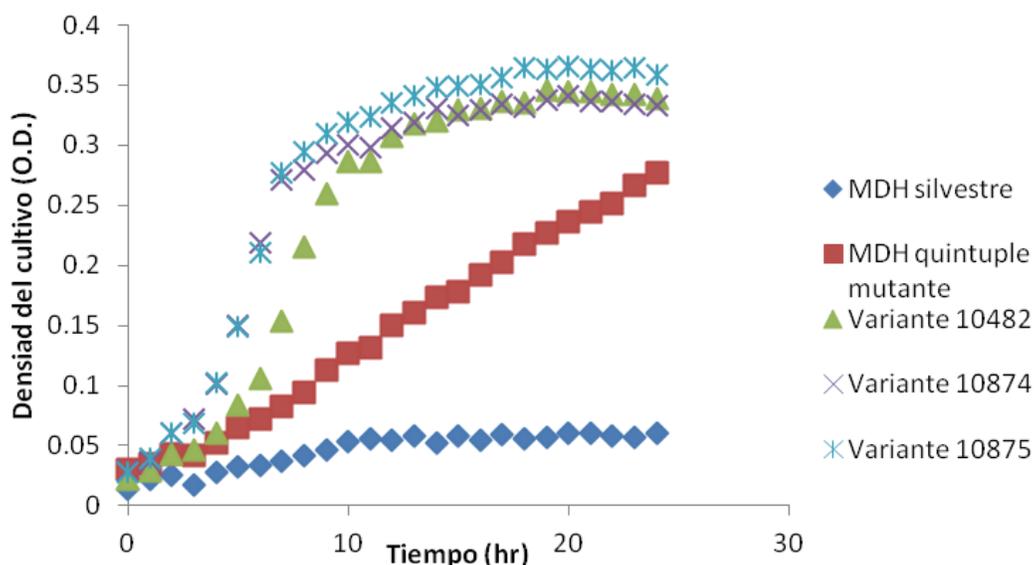


Figura 7. Curvas de crecimiento bacteriano obtenido en condiciones de anaerobiosis de células Val23 para las diferentes variantes empleadas en este trabajo. La medición de crecimiento para cada variante se realizó por triplicado.

Los resultados obtenidos al realizar los cultivos en anaerobiosis confirman que el método de selección propuesto por Vázquez-Limón *et al.* (2007), el cual se basa en la capacidad de regeneración del  $\text{NAD}^+$  como una limitante del crecimiento celular, puede ser usado exitosamente para seleccionar variantes que presenten una ventaja selectiva en un ambiente extremo, tal como ocurre en uno de índole anaeróbica. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de las bacterias que expresan la enzima MDH silvestre y la MDH quintuple mutante son 0.0045 ODs/s y 0.0118 ODs/s respectivamente, mientras que las bacterias que expresan las variantes obtenidas por evolución dirigida tienen los siguientes valores de  $\mu$ : 10482, 0.037 ODs/s, 10874 ODs/s, 0.036 ODs/s y 10875, 0.039 ODs/s, con una tasa de crecimiento específico tres veces superior al de las variantes expresando la MDH quintuple mutante.

Es interesante hacer notar que la malato deshidrogenasa es incapaz de participar en los procesos fermentativos que permiten el crecimiento celular en anaerobiosis, ya que al encontrarse las vías que conducen a la formación de acetato y lactato detenidas, el crecimiento se interrumpe totalmente. Por otra parte, se observa que las mutaciones añadidas a la MDH quíntuple mutante no permiten un mayor crecimiento respecto de la mutante sencilla, aparentemente menos eficiente. Sin embargo, las mutaciones añadidas en este trabajo, usando el método de evolución dirigida, permiten una mayor capacidad de crecimiento al complementar a la bacteria con una enzima con aparente capacidad de lactato deshidrogenasa más eficiente.

### **c) Análisis De Secuencias**

El alineamiento de las estructuras primarias de las variantes obtenidas por PCR mutagénica con la MDH quintuple mutante se muestra en la figura 8, así como el resultado del análisis es mostrado en la tabla 2.



Tabla 2. Características de la MDH quintuple mutante y de las variantes obtenidas por PCR mutagénica. Las mutaciones presentes en la MDH quintuple mutante se encuentran también en las variantes obtenidas por evolución dirigida.

Clona	# Mutaciones	Posición aminoácido	Cambio aa Original:actual
Quintuple mutante	5	12 81 85 210 214	Ile Val Arg Gln Met Glu Gly Ala Val Ile
10482	2	35 73	Ile Val Val Ala
10874	2	76 157	Ser Pro Phe Leu
10875	1	118	Thr Ala

#### d) Determinación de Posible Actividad LDH

Con base en la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de la malato deshidrogenasa quintuple mutante para piruvato, la cual es de 13 mM (Yin y Kirsch, 2007) se decidió emplear un rango de concentraciones que van desde 2 mM a 50 mM de piruvato para cada una de las variantes generadas por transformación de células Val23 con el banco de selección obtenido a partir de la PCR mutagénica.

Tomando como criterio de selección el tamaño alcanzado por la colonia, se analizó la actividad LDH de las colonias que portaban las variantes obtenidas por evolución dirigida, midiendo el cambio en la absorbancia minuto a minuto debido

a la desaparición del NADH+H<sup>+</sup>. Dicho resultado se muestra en la tabla 3 y en la figura 9.

Tabla 3. Consumo de NADH+H<sup>+</sup> en las clonas portando las variantes obtenidas por evolución dirigida y los controles utilizados.

Clona	Consumo de NADH+H <sup>+</sup> (nM)
MDH <i>Escherichia coli</i>	500
MDH mutante sencilla	700
MDH quintuple mutante	1300
Variante 10482	8600
Variante 10874	7000
Variante 10875	2900
LDH <i>Escherichia coli</i>	14600

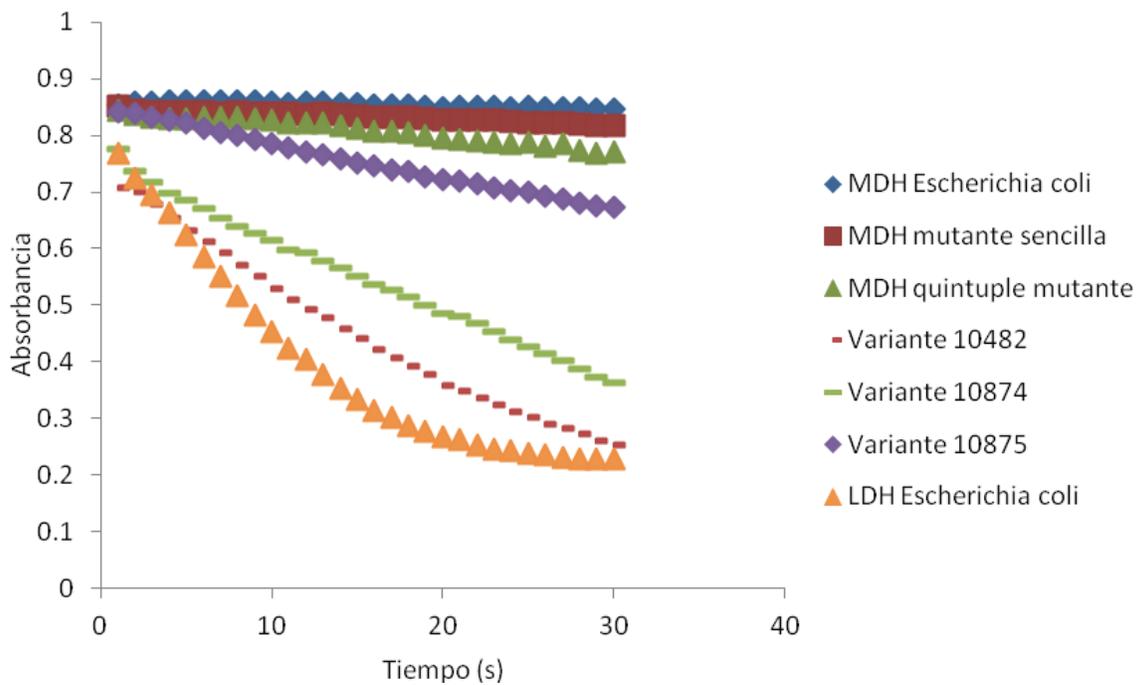


Figura 9. Velocidad de reacción enzimática en base al consumo de NADH de las variantes seleccionadas en 5 mM piruvato.

Al analizar la tabla de consumo de NADH+H<sup>+</sup> observamos que las variantes obtenidas por evolución dirigida pueden reciclar el cofactor con mayor eficiencia que la MDH quintuple mutante parental. Decidimos analizar estas variantes en donde esta tendencia fuera mayor, tal como la variantes 10482 y 10874 cuyo consumo de NADH+H<sup>+</sup> fue seis y cinco veces superior al de la MDH quintuple mutante parental. También decidimos analizar la variante 10875, cuyo nivel de consumo del cofactor fue dos veces superior al de la MDH quintuple mutante.

Es importante decir que las células que portan la lactato deshidrogenasa silvestre tienen controlada la expresión del gen que codifica para dicha enzima por el promotor *trc*, el cual es una combinación de los promotores del triptofano y la

lactosa, siendo éste un promotor fuerte inducible por IPTG (Egon et al. 1983), mientras que las variantes generadas se encuentran bajo el control del promotor de la B-lactamasa, el cual por contraste es un promotor débil constitutivo (Osuna et al. 2002). Así, con el objetivo de purificar las proteínas y determinar de esta manera sus parámetros catalíticos decidimos insertar los genes que codifican para las variantes elegidas y los controles utilizados en el vector pTrc99-A para conseguir una mayor cantidad de enzima y poder determinar de esta manera sus parámetros catalíticos.

#### **e) Obtención de Parámetros Catalíticos**

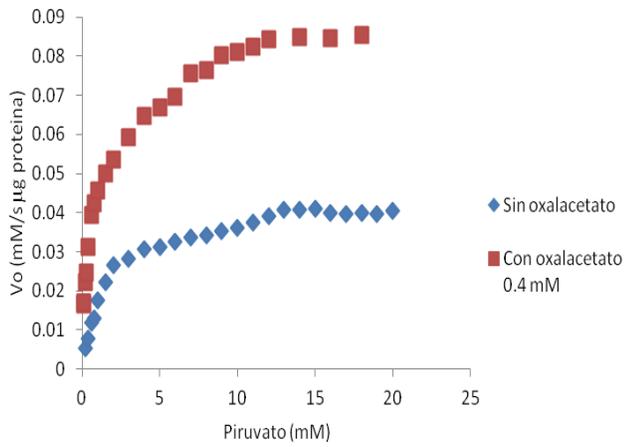
Con el objeto de comprobar la actividad de los controles y las variantes obtenidas por PCR mutagénica que tienen una actividad LDH aparentemente significativa, se realizaron los ensayos enzimáticos empleando las proteínas purificadas por la técnica de cromatografía de afinidad con colas de histidina, con diferentes concentraciones de piruvato. Además, con el fin de observar el comportamiento de la enzima hacia su sustrato original, también se realizaron dichos ensayos empleando oxalacetato como sustrato. También se realizaron estos ensayos para medir la afinidad de las diversas variantes hacia el cofactor, para lo cual la concentración de piruvato se mantuvo constante y se añadían diferentes concentraciones de  $\text{NADH}+\text{H}^+$ . Como se observa más adelante, la afinidad hacia el oxalacetato se recupera en las variantes obtenidas por evolución dirigida, actividad que perdió la MDH quintuple mutante; por esta razón, también se

realizaron las pruebas para medir la actividad de las diversas variantes hacia piruvato, usando el oxalacetato como un posible activador.

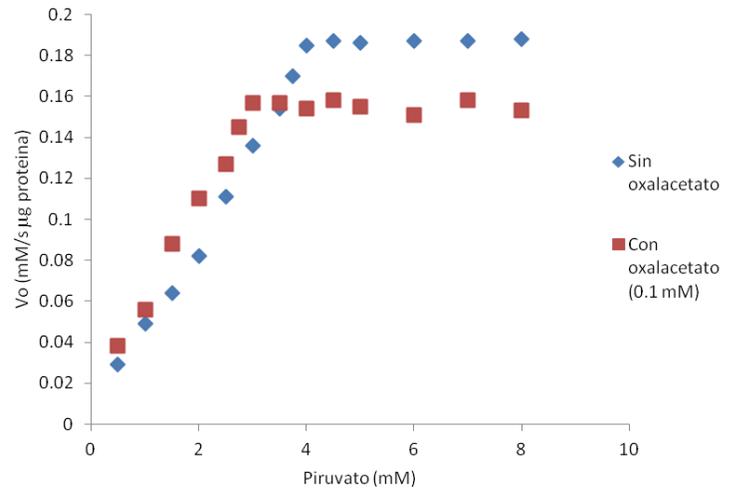
Las variantes obtenidas en este trabajo son derivadas de aquella MDH quintuple mutante que Yin y Kirsch obtuvieron en el 2007, la cual pierde prácticamente su actividad natural hacia oxalacetato, adquiriéndola en cambio hacia piruvato, con lo que su especificidad es revertida, por lo que una mayor capacidad LDH puede ser esperada en las variantes obtenidas por evolución dirigida. En la figura 10 se observa la curva de actividad enzimática con piruvato y con piruvato en presencia de oxalacetato de las diferentes variables utilizadas, así como en la tabla 4 se muestran los parámetros catalíticos.

Tabla 4. Parámetros catalíticos de la MDH quintuple mutante y variantes obtenidas por evolución dirigida con piruvato y piruvato en presencia de oxalacetato.

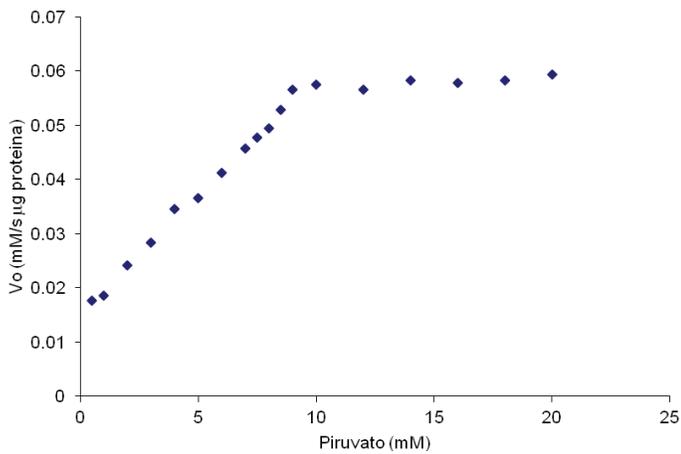
Variante MDH	Kcat (s <sup>-1</sup> )		Km (mM)		Kcat/Km (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
	Sin OAA	Con OAA	Sin OAA	Con OAA	Sin OAA	Con OAA
<b>MDH quintuple mutante</b>	511.74	1449.33	1.58	1.78	3.2x10 <sup>8</sup>	8.2x10 <sup>8</sup>
<b>Variante 10482</b>	184.81	143.86	4.98	1.68	0.37x10 <sup>8</sup>	0.86x10 <sup>8</sup>
<b>Variante 10874</b>	413.17	ND	3.89	ND	1.1x10 <sup>8</sup>	ND
<b>Variante 10875</b>	216.02	197.5	7.62	7.34	0.28x10 <sup>8</sup>	0.27x10 <sup>8</sup>



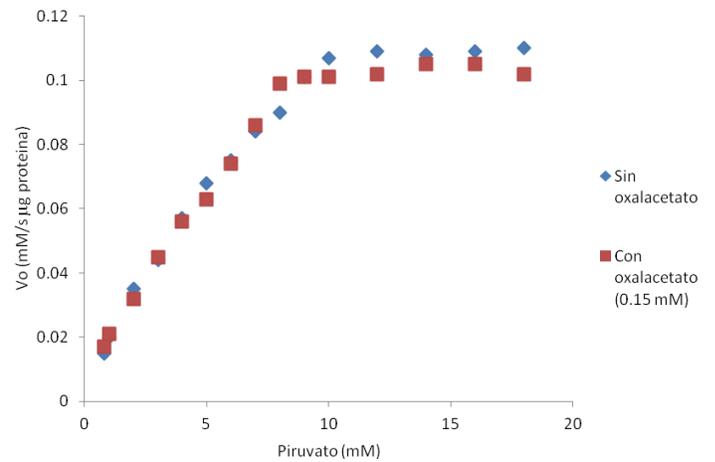
A



B



C



D

Figura 10. Curvas de actividad enzimática de A. MDH quintuple mutante, B. variante 10482, C. variante 10874 y D. variante 10875 empleando diferentes concentraciones de piruvato y piruvato en presencia de oxalacetato.

El análisis de la actividad de esta enzima con el piruvato indica una mayor afinidad de la MDH quintuple mutante hacia el piruvato a lo reportado por Yin y Kirsch (2007) pues la  $K_m$  parece estar aproximadamente en el rango de 2 mM; por lo demás, la curva obtenida demuestra que la actividad enzimática de esta enzima con el piruvato es deficiente, aunque presente una actividad LDH claramente definida. Sin embargo, es posible observar una mejora en la afinidad de la enzima con piruvato al añadir una concentración de oxalacetato, aunque la eficiencia catalítica se mantenga prácticamente igual. Esta última curva se ajustó con un modelo alostérico, indicando que el oxalacetato puede funcionar como un activador en esta enzima, presentando una mejor actividad catalítica. Los resultados obtenidos al medir la actividad LDH de los extractos celulares aparentemente indican que la variante 10482 es la más eficiente en este sentido, entre las mutantes obtenidas. Sin embargo, esto no se ve reflejado en los parámetros catalíticos de esta enzima si se la compara con la quintuple mutante parental, ya que tanto la eficiencia catalítica como la afinidad con el sustrato de esta variante parecen ser inferiores, lo que hace difícil explicar una mejora en el crecimiento en anaerobiosis de esta variante mediante un incremento en la actividad de la enzima hacia el piruvato. Por otra parte, esta enzima presenta también activación por oxalacetato, diferenciándose de la quintuple en que la afinidad por el sustrato es lo que mejora en este caso, pasando de una  $K_m$  de 4.98 mM a 1.68 mM. Otra variante que en los experimentos anteriores demostró tener una alta capacidad para reducir el piruvato es la número 10874; esta variante presenta una eficiencia catalítica superior a la variante 10482, aunque la  $K_m$  es similar a ésta (3.89 mM); sin embargo, en este caso, la curva se ajustó con

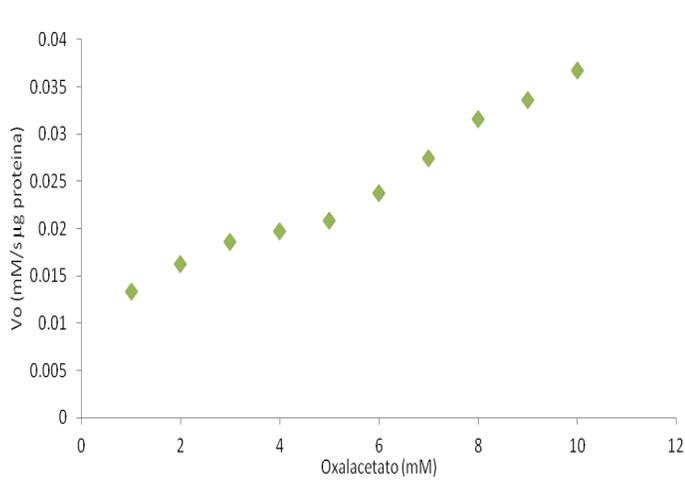
un modelo michaeliano, por lo que podemos decir que en este caso no existe activación por sustrato. Comparado con la MDH quintuple mutante sigue siendo inferior respecto a su actividad LDH. De las variantes analizadas la que presentó menor afinidad con el piruvato fue la variante 10875, teniendo una  $K_m$  de 7.62 mM; tampoco se observa activación por oxalacetato. Esta variante es la que presenta menor actividad LDH de las estudiadas.

Dado que el oxalacetato es el sustrato natural de la MDH decidimos probar la actividad de esta enzima y de las variantes generadas por evolución dirigida con este sustrato. En la figura 11 se observa la curva de actividad enzimática con oxalacetato de las diferentes variables utilizadas, así como en la tabla 5 se muestran los parámetros catalíticos.

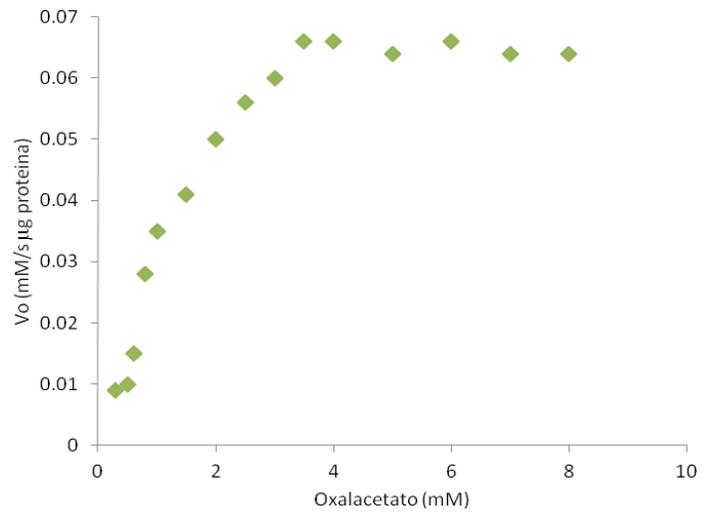
Tabla 5. Parámetros catalíticos de la MDH quintuple mutante y variantes obtenidas por evolución dirigida con oxalacetato

<b>Variante MDH</b>	<b>Kcat (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Km (mM)</b>	<b>Kcat/Km (mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>
MDH quintuple mutante	ND	ND	.03x10 <sup>6</sup>
Variante 10482	58.92	1.12	52.7x10 <sup>6</sup>
Variante 10874*	ND	ND	7.1x10 <sup>6</sup>
Variante 10875	308.63	6.54	47.23x10 <sup>6</sup>

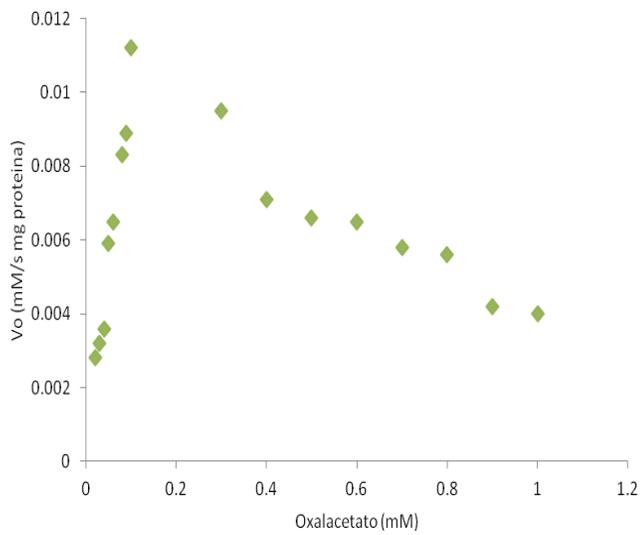
\*En el caso de la variante 10874 no se lograron medir los parámetros catalíticos por presentar inhibición por sustrato



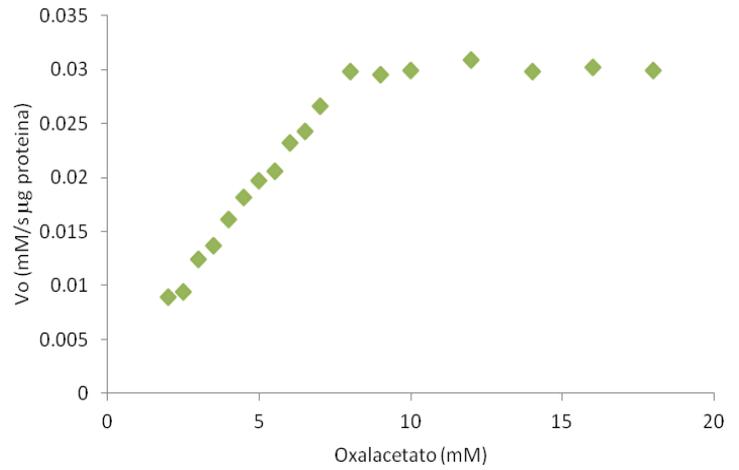
A



B



C



D

Figura 11. Curvas de actividad enzimática de A. MDH quintuple mutante, B. variante 10482, C. variante 10874 y D. variante 10875 empleando diferentes concentraciones de oxalacetato.

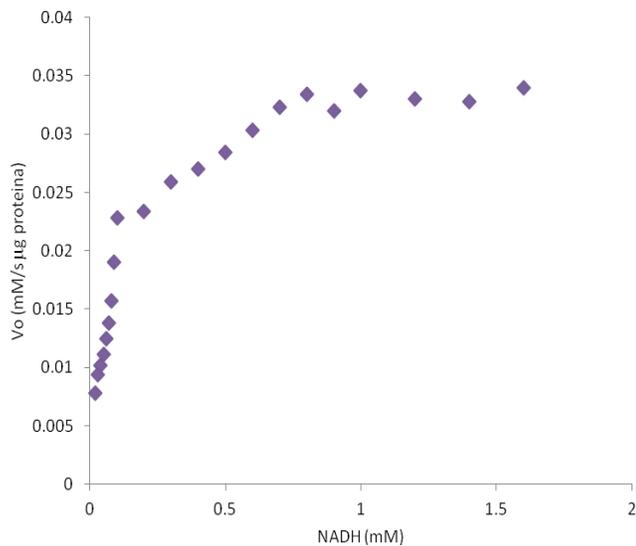
Lo primero que se observa al estudiar esta figura es que la actividad de la MDH quíntuple mutante con el oxalacetato prácticamente se pierde y no fue posible construir la curva de Michaelis-Menten, al no alcanzarse la velocidad máxima de la enzima, por lo que no es posible determinar los parámetros catalíticos en este caso. Es interesante conocer la actividad de las variantes obtenidas por evolución dirigida con este sustrato. Al analizar la actividad que la variante 10482 presenta con el oxalacetato se encuentra que la restaura; la  $K_m$  en esta variante para el oxalacetato se encuentra aproximadamente en el valor de 1 mM y la curva obtenida demuestra que su eficiencia catalítica es notablemente superior incluso a la obtenida con piruvato. La variante 10874 se diferencia respecto a las demás con respecto a su interacción con el oxalacetato, pues se encontró que a partir de 1 mM se presentó una inhibición que afecta gradualmente la actividad de la enzima conforme aumenta la concentración del sustrato; por otro lado, a concentraciones menores de oxalacetato, la enzima se comporta con gran eficiencia. Cabe decir que esta capacidad de la variante 10874 para reducir concentraciones tan pequeñas de oxalacetato, dificultó enormemente encontrar la concentración adecuada para observar activación de la actividad LDH en presencia de este sustrato, por lo que dicha prueba se omitió en esta variante. La variante 10875 también restituye la actividad con el oxalacetato, aunque su afinidad por dicho sustrato sea menor que en la variante 10482 y, al menos en apariencia, que en la variante 10874, encontrándose su  $K_m$  alrededor de 6 mM.

Para demostrar que la mejor capacidad en el crecimiento de las clonas portando las variantes obtenidas por evolución dirigida podía ser debido a mayor eficiencia catalítica y/o afinidad por el cofactor, decidimos determinar los parámetros

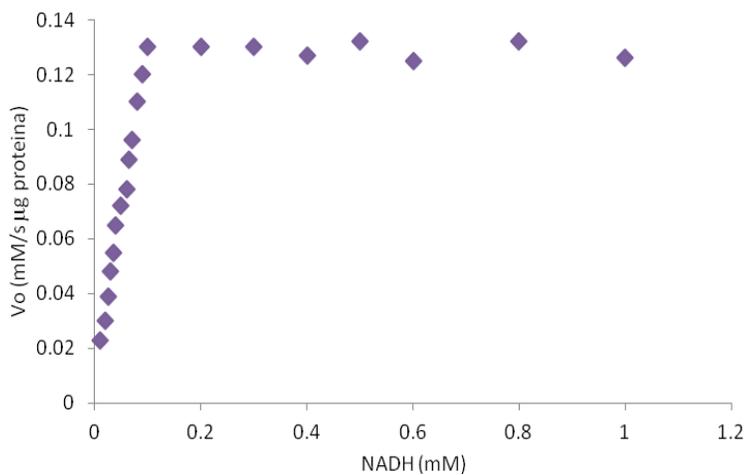
catalíticos hacia el cofactor. En la figura 12 se observa la curva de actividad enzimática con NADH+H<sup>+</sup> de las diferentes variables utilizadas, así como en la tabla 6 se muestran los parámetros catalíticos.

Tabla 6. Parámetros catalíticos de la MDH quintuple mutante y variantes obtenidas por evolución dirigida con NADH+H<sup>+</sup>.

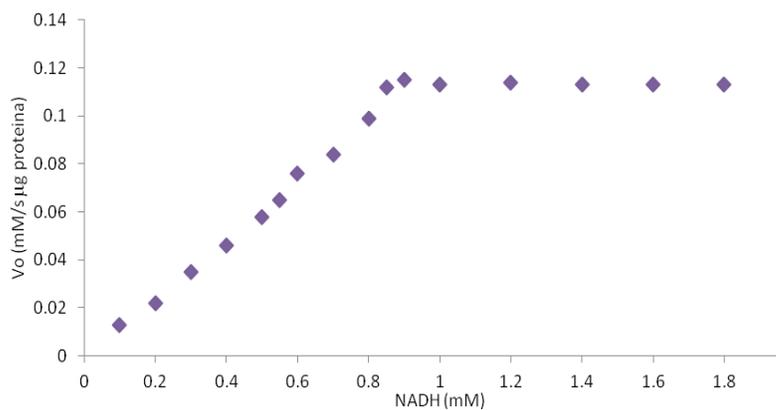
<b>Variante MDH</b>	<b>Kcat (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Km (mM)</b>	<b>Kcat/Km (mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>
<b>MDH quintuple mutante</b>	421.6	0.093	4.52x10 <sup>9</sup>
<b>Variante 10482</b>	114.75	0.043	2.89x10 <sup>9</sup>
<b>Variante 10874</b>	279.77	0.17	1.6x10 <sup>9</sup>
<b>Variante 10875</b>	267.8	0.34	0.8x10 <sup>9</sup>



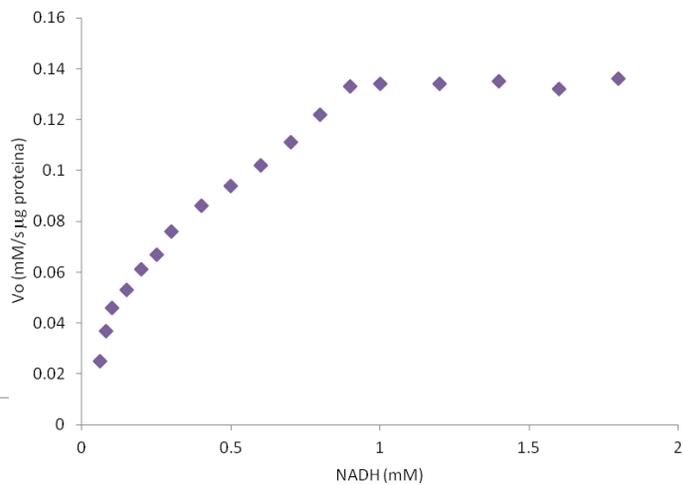
A



B



C



D

Figura 12. Curvas de actividad enzimática de A. MDH quintuple mutante, B. variante 10482, C. variante 10874 y D. variante 10875 empleando diferentes concentraciones de NADH+H<sup>+</sup>.

Aunque la variantes 10482 presentó una afinidad similar por el cofactor que la MDH quíntuple mutante parental no presenta una mejor eficiencia catalítica al oxidar el  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , por lo que no se puede explicar una mejora en el crecimiento celular en base a una mayor capacidad de oxidar dicho sustrato. Las variantes 10874 y 10875 fueron inferiores en este aspecto a la MDH quíntuple mutante tanto en afinidad como en eficiencia catalítica.

#### **f) Análisis de estructuras**

Con el objetivo de entender el efecto que las mutaciones generadas en los diferentes genes de las proteínas analizadas en este trabajo tienen en su comportamiento cinético, analizamos las estructuras terciarias de éstas. En las figuras 13 a 16 se observan las estructuras ternarias de las variantes estudiadas en la región del sitio activo.

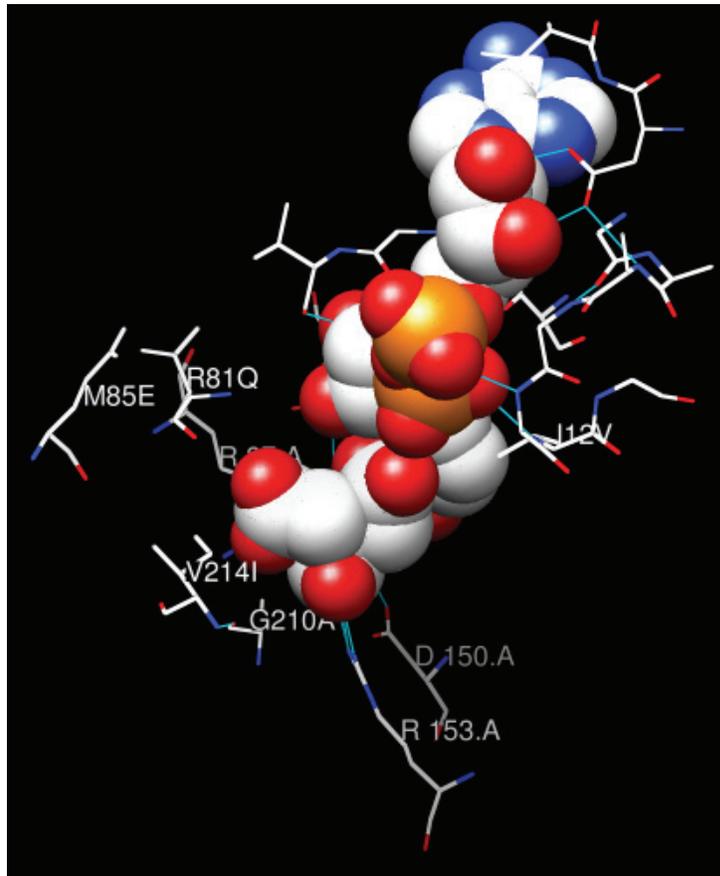


Figura 13. Sitio activo de la MDH donde se muestran las mutaciones en la MDH quintuple mutante. R87, D150 y R153 intervienen en la catálisis (Bell *et al.* 2001). Imagen de gráfico molecular realizado usando el paquete UCSF Chimera del Departamento de Biocómputo, Visualización e Informática de la Universidad de California, San Francisco (Pettersen *et al.* 2004).

Las mutaciones generadas por Yin y Kirsch al construir la MDH quintuple mutante (2007) se encuentran muy cerca del sitio activo, en particular con el sitio de unión al oxalacetato, a excepción de la mutación I12V, el cual se encuentra cerca del sitio de unión al cofactor; en general, los autores reportan que las mutaciones

encontradas pueden revertir la especificidad del sustrato, pero sólo estando las cinco presentes, se obtiene una lactato deshidrogenasa con el 0.1% de la actividad de la enzima silvestre. En este sentido es interesante hacer notar que dos de los aminoácidos mutados se encuentran unidos por un puente de hidrógeno (G210A-V214I) y la mutación M85E se encuentra muy cerca de la mutación R81Q, la cual se ha reportado que afecta seriamente la actividad catalítica de la enzima al perderse una de las argininas que estabilizan al sustrato (Nicholls et al. 1992); posiblemente, existe algún tipo de interacción entre estos aminoácidos que permitan recuperar parcialmente la estabilidad de la enzima (Figura 13).

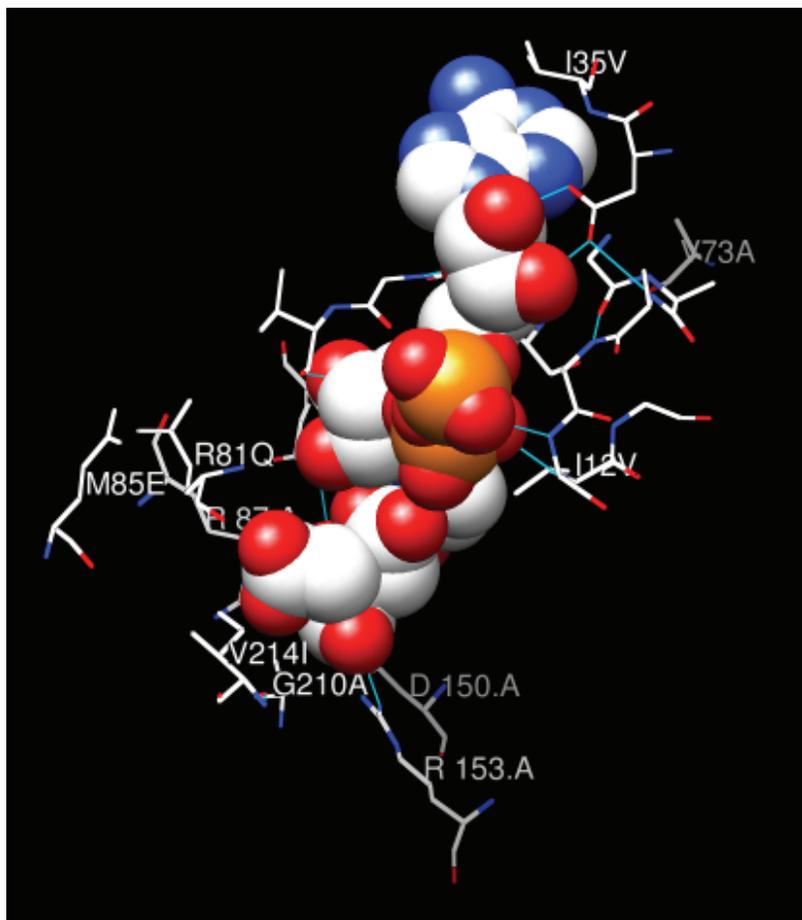


Figura 14. Sitio activo de la MDH donde se muestran las mutaciones en la variante 10482. R87, D150 y R153 intervienen en la catálisis (Bell *et al.* 2001). Imagen de gráfico molecular realizado usando el paquete UCSF Chimera del Departamento de Biocómputo, Visualización e Informática de la Universidad de California, San Francisco (Pettersen *et al.* 2004).

Algo interesante que se observa al analizar la variante 10482 es que todas las curvas se ajustaron mejor con un modelo alostérico, lo que la diferencia de la MDH quintuple mutante; es probable que los mismos sustratos activen los diferentes

sitios activos de la enzima de modo cooperativo. Sorprendentemente, las mutaciones encontradas en esta mutante no se encuentran cerca del sitio de unión al sustrato, sino del sitio de unión al cofactor; en particular, la mutación I35V interacciona con el aspartato en la posición 34, el cual se encuentra que interacciona fuertemente con el NADH+H<sup>+</sup>. Además de su interacción con el cofactor, este aminoácido sirve de punto de unión entre un alfa-hélice y una lámina beta, por lo que también le puede dar más estabilidad a la proteína (Figura 14).

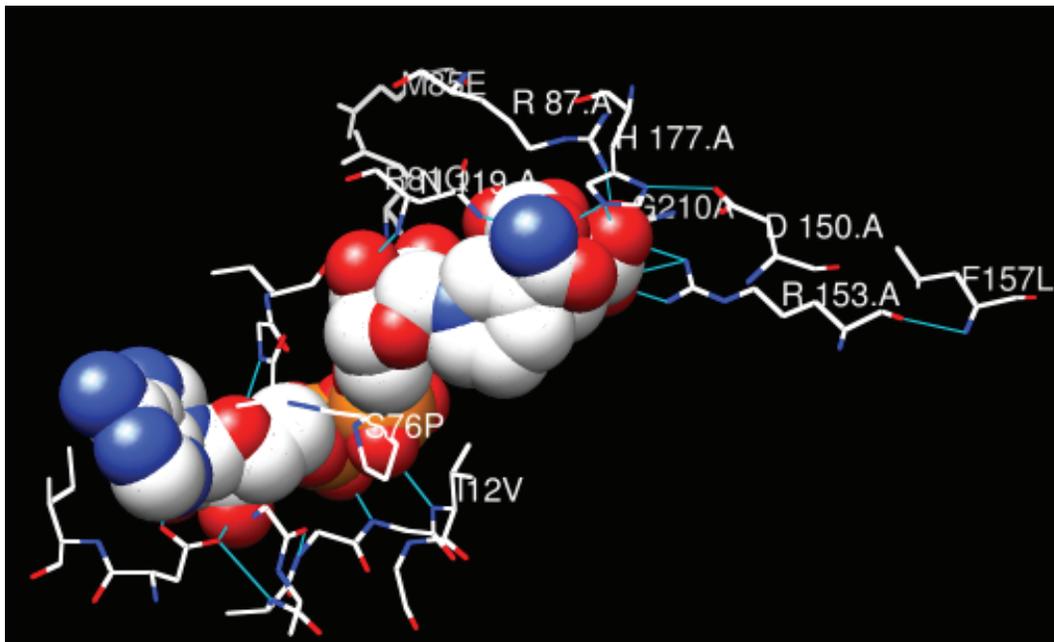


Figura 15. Sitio activo de la MDH donde se muestran las mutaciones en la variante 10874. N119, R87, H177, D150 y R153 intervienen en la catálisis (Bell *et al.* 2001).

Imagen de gráfico molecular realizado usando el paquete UCSF Chimera del Departamento de Biocómputo, Visualización e Informática de la Universidad de California, San Francisco (Pettersen *et al.* 2004).

Las características presentadas por la variante 10874 parecen ser debidas a la mutación F157L, la cual interacciona con la arginina en la posición 153, la cual se

ha reportado que es crucial para orientar al sustrato durante la interconversión de oxalacetato y malato (Bell et al. 2001). Posiblemente, en estas circunstancias el sitio activo se encuentre obstruido por el sustrato, afectando su actividad.

La otra mutación, S76P, se encuentra cerca del sitio de unión al cofactor, y posiblemente influye negativamente en la unión con éste, al dar demasiada rigidez a la estructura (Figura 15).

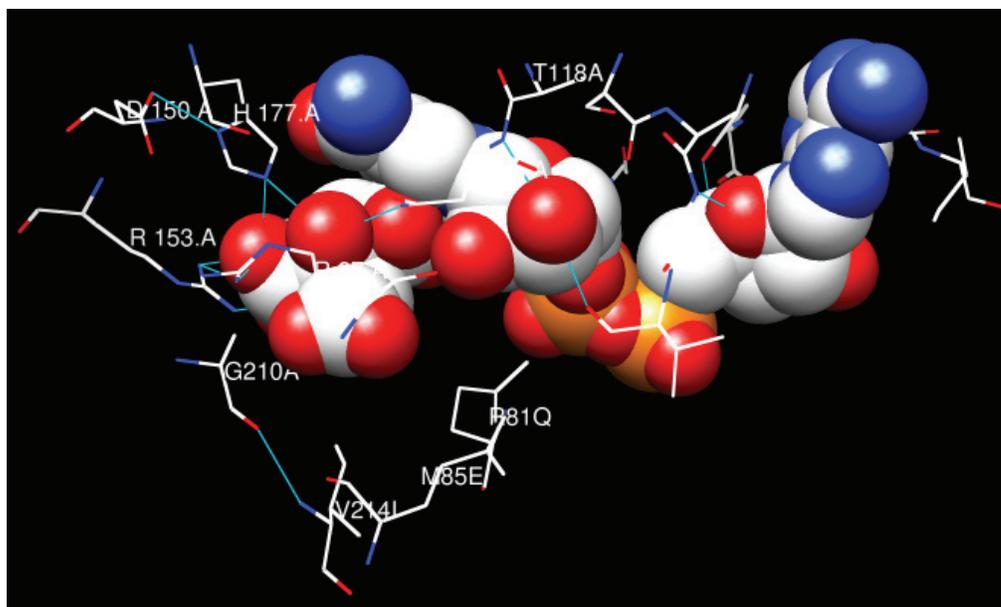


Figura 16. Sitio activo de la MDH donde se observan las mutaciones en la variante 10875. D150, R153 y H177 intervienen en la catálisis (Bell et al. 2001). Imagen de gráfico molecular realizado usando el paquete UCSF Chimera del Departamento de Biocómputo, Visualización e Informática de la Universidad de California, San Francisco (Pettersen et al. 2004).

De la misma manera que en el caso de lo observado en el caso de la variante 10482, la mutación encontrada en la variante 10875 (T118A) también se encuentra cerca del sitio de unión al  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , influyendo probablemente este

factor en la capacidad de unión al cofactor; además, se encuentra cerca de la asparagina 119, la que se sabe que interacciona de manera importante con el cofactor (Bell et al. 2001), además de encontrarse entre un alfa-hélice y una lámina-beta, lo que nos podría llevar a pensar en alteraciones en la estabilidad de la enzima; sin embargo, el cambio mas destacado en esta variante, al igual que en las anteriores, es la restitución de la actividad hacia oxalacetato.

Las bacterias que expresaban las variantes obtenidas por evolución dirigida a partir de la MDH quántuple mutante, presentaron una aparente mejora en el crecimiento, en un ambiente anaeróbico, en comparación con la enzima parental. Sin embargo, el análisis de los parámetros catalíticos obtenidos para el piruvato no parece indicar que este aumento en el crecimiento se deba a una mayor capacidad de regenerar el  $\text{NAD}^+$  mediante la reducción del piruvato a lactato; aparentemente, también queda descartada la posibilidad que la mayor capacidad en el crecimiento anaeróbico sea debido a una mayor capacidad de oxidar el cofactor, lo que se traduciría en una regeneración de  $\text{NAD}^+$  más eficiente, ya que aunque la variante 10482 presenta una afinidad por el cofactor similar a la MDH quántuple, no supera su eficiencia catalítica.

Notablemente, las variantes obtenidas por evolución dirigida recuperaron la actividad con el oxalacetato, y este resultado nos induce a pensar que la regeneración de  $\text{NAD}^+$  se este dando mediante la reducción del oxalacetato a malato mediante la vía del succinato. Respecto a esto último, a pesar de que la MDH quántuple mutante presentó un aumento en la actividad catalítica hacia piruvato en presencia de oxalacetato, la variante 10482 presentó una mejora en la  $K_m$  en presencia de este compuesto al obtener la curva enzimática para el

piruvato y la variante 10874 se observó que lo reconocía a concentraciones muy bajas, por lo que esta capacidad superior de reconocer el oxalacetato le daría la ventaja a estas variantes respecto de la MDH quíntuple mutante en el momento de reducir el piruvato a lactato. Otra posibilidad a tener en cuenta es un mayor nivel de expresión de la enzima en las variantes obtenidas, lo que se traduciría en una ventaja selectiva al momento de crecer en un ambiente carente de oxígeno.

Un detalle interesante digno de mención es que en las curvas de actividad enzimática se observó por lo general un fenómeno tipo alostérico, como en todas las curvas obtenidas para la variante 10482 (Figuras 17 a 19), la obtenida para NADH+H<sup>+</sup> en la variante 10874 (Fig. 23) y las obtenidas para piruvato en la variante 10875 (Fig. 25). Esta tendencia nos puede indicar que la activación de la enzima por esta vía puede influir en su mejor capacidad de regenerar el cofactor y, por tanto, incrementar el crecimiento a nivel celular.

La restauración en la actividad hacia el oxalacetato, junto con el aumento en la actividad hacia el piruvato, si se compara con la MDH quíntuple mutante, nos demuestra que es posible obtener variantes de la MDH funcionales con capacidad adicional para reconocer otro sustrato, en este caso el piruvato.

## VII. Conclusiones

- a) Se obtuvieron variantes de la MDH con actividad LDH mediante el método de evolución dirigida con actividad LDH a partir de una malato deshidrogenasa con cinco mutaciones con actividad LDH comprobada (Yin y Kirsch, 2007). A estas variantes se les nombró como variantes 10482, 10874 y 10875.
- b) El método de selección propuesto por Vázquez-Limón *et al.* (2007) basado en la selección de colonias a partir de un tamaño superior, obtenido por un aumento en la capacidad de regeneración del cofactor fue exitoso.
- c) Tanto la MDH quántuple mutante, como las variantes obtenidas por evolución dirigida restauraron el crecimiento en anaerobiosis al obtener capacidad de reducir el piruvato; sin embargo, el crecimiento celular de estas últimas fue marcadamente superior.
- d) Las variantes obtenidas por evolución dirigida no fueron mas eficientes al reducir el piruvato a lactato.
- e) La MDH quántuple mutante y la variante 10482 presentaron activación por oxalacetato al reducir el piruvato a lactato.
- f) Las variante 10482 presenta una afinidad similar por el  $\text{NADH}+\text{H}^+$  al de la MDH quántuple mutante parental
- g) Las variantes obtenidas por evolución dirigida restituyeron la actividad hacia oxalacetato, actividad perdida por la MDH quántuple mutante.
- h) La variante 10874 presentó inhibición a nivel del sustrato en presencia de oxalacetato.

- i) Se observó activación alostérica en la curva obtenida para piruvato en presencia de oxalacetato en la MDH quintuple mutante.
- j) Se observó activación alostérica en las curvas obtenidas para piruvato, oxalacetato y  $\text{NADH}+\text{H}^+$  en la variante 10482
- k) Se observó activación alostérica en la curva obtenida para  $\text{NADH}+\text{H}^+$  en la variante 10874.

## VIII. Bibliografía

Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K. y Gershenson, A. (2001). How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends in Biochem. Sci.* 20:100-106.

Barstow, D.A., Clarke, A.R., Chia, W.N., Wigley, D., Sharman, A.F., Holbrook, J.J., Atkinson, T., Minton, N.P. (1986). Cloning expression and complete nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* L-lactate dehydrogenase gene. *Gene.* 46:47-56.

Bell, J.K., Yennawar, H.P., Wright, S.K., Thompson, J.R., Viola, R.E., Banaszak, L.J. (2001). Structural Analyses of a Malate Dehydrogenase with a Variable active Site. *J.Biol.Chem.* 276 (33): 31156-31162.

Binay, B. y Karaguler, N.G. (2007). Attempting to remove the substrate inhibition of L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* by site-directed mutagenesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 141 (2-3): 265-272.

Boernke, W.E., Millard, C.S., Stevens, P.W., Kakar, S.N., Stevens, F.J. y Donnelly, M.I. (1995). Stringency of substrate specificity of *Escherichia coli* malate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 322:43-52.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Bunch, P.K., Mat Jan, F., Lee, N. y Clark, D.P. (1997). The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology (UK).* 143:187-195.

Campbell, J.H., Lengyel, L.A. y Langridge, J. (1973). Evolution of a second gene for beta-galactosidase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:1841-1845.

Clark, D.P. (1989). The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 5 (3): 223-234.

Clarke, A.R., Wigley, D.B., Chia, W.N., Barstow, D., Atkinson, T. y Holbrook, J.J. (1986). Site-directed mutagenesis reveals role of mobile arginine residue in lactate dehydrogenase catalysis. *Nature.* 324:699-702.

Doelle, H.W., Ewings, K.N. y Hollywood, N.W. (1981). Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 23:1-36.

Egon, A., Brosius, J., and Ptashne, M. (1983). Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 25, 167-178.

Giver, L.A., Gershenson, P.O., Freskgard y Arnold, F.H. (1998). Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:12809-12813.

Goward, C.R. y Nicholls, D.J. (1994). Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein science*. 3:1883-1888.

Hofvendal, K. y Hahn-Hagerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26:87-107.

Ikushima, S., Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshida, S. y Yoshida, A. (2009). Genetic engineering of *Candida utilis* yeast for efficient production of L-lactic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:1818-1824.

Jia, J., Mu, W., Zhang, T. y Jiang, B. (2010). Bioconversion of phenylpyruvate to phenyllactate: gene cloning, expression, and enzymatic characterization of D- and L-lactate dehydrogenases from *Lactobacillus plantarum* SK002. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162 (1): 242-251.

Jung, S., Honegger, A. y Pluckthun, A. (1999). Selection for improved protein stability by phage display. *J. Mol. Biol.* 294:163-180.

Kiss, C., Temirov, J., Chasteen, L., Waldo, G.S. y Bradbury, A.R.M. (2009). Directed evolution of an extremely stable fluorescent protein. *Prot. Eng. Des & Sel.* 22:313-323.

Lara, A.R., Vazquez-Limon, C., Gosset, G., Bolivar, F., Lopez-Mungia, A. y Ramirez, O.T. (2006). Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 94:1164-1175.

Lutz, S. y Patrick, W.M. (2004). Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity. *Curr. Opin. In Biotechnol.* 15:291-297.

Mayr, U., Hansel, R., Debarade, M., Pauly, H.E., Pfeilderer, G. Y Tromer, W.E. (1982). Structural function relationship in the allosteric L lactate dehydrogenases from *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus curvatus*. *Eur J. Biochem.* 126:549 558.

McEvily, A.J., Mullinax, T.R., Dulin, D.R. y Harrison, J.H. (1985). Regulation of mitochondrial malate dehydrogenase: kinetic modulation independent of subunit interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 238:229-236.

Merz, A. (2000). Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry.* 39:880-889.

Nicholls, D.J., Miller, J., Scawen, M.D., Clarke, A.R., Holbrook, J.J., Atkinson, T. y Goward, C.R. (1992). The importance of arginine 102 for the substrate specificity of *Escherichia coli* malate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1057-1062.

Osawa, F., Fujii, T., Nishida, T., Tada, N., Ohnishi, T., Kobayashi, O., Komeda, T. y Yoshida, S. (2009). Efficient production of L-lactic acid by Crabtree-negative yeast *Candida boidinii*. *Yeast.* 26:485-496.

Osuna, J., Pérez-Blancas, A. y Soberón, X. (2002). Improving a circularly permuted TEM-1 B-lactamase by directed evolution. *Prot. Eng.* 15:463-470.

Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez Leon, J.A. y Nigam, P. (2001). Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. Asiatech publishers, New Delhi.

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

Prachayasittikul, V., Lgung, S., Isarankura-Na-Ayudhya, C. y Bulow, L. (2006). NAD(H) recycling activity of an engineered bifunctional enzyme galactose dehydrogenase/lactate dehydrogenase. *Int. J. Biol. Sci.* 2 (1): 10-16.

Reetz, M.T. (2004). Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 5716-5722.

Soberon, X. y Montero ,G.M. (2004). Ingeniería de proteínas y evolución dirigida en: Bolivar,F. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna cap 7. pags. 195-217.

Stemmer, W.P.C. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature.* 370:389-391.

Sundaram, T.K., Wright, I.P. y Wilkinson, A.E. (1980). Malate dehydrogenase from thermophilic and mesophilic bacteria. Molecular size, subunit structure, amino acid composition, immunochemical homology, and catalytic activity. *Biochemistry:* 2017-2022.

Tarmy, E.M. y Kaplan, N.O. (1968). Chemical characterization of D lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243:2579 2586.

Utrilla, J., Gosset, G. y Martinez, A. (2009). ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:1057-1062.

Vazquez-Limon, C., Vega-Badillo, J., Martinez, A., Espinosa-Molina, G., Gosset, G., Soberon, X., Lopez-Munguia, A. y Osuna, J. (2007). Growth rate of a non-fermentative *Escherichia coli* strain is influenced by NAD(+) regeneration. *Biotechnol.Lett.* 29: 1857-1863 .

Wilks, H.M., Hart, K.W., Feeney, R., Dunn, C.R. Muirhead, H., Chia, W.N., Barstow, D.A., Atkinson, T., Clarke, A.R. y Holbrook, J.J. (1988). A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework. *Science.* 242:1541-1544.

Wu, H., Li, Z., Zhou, L. y Ye, Q. (2007). Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli pflB ldhA* double mutant as a result of enhanced anaplerotic activities in the preceding aerobic culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 624:7837-7843.

Yang, Y.T., Bennett, G.N. y San, K.Y. (2001). The effects of feed and intracellular pyruvate levels on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 3:115-123.

Yang, Y.T., San, K.Y. y Bennett, G.N. (1999). Redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* with fermentative lactate dehydrogenase overexpression and deletion. *Metab. Eng.* 1:141-152.

Yin, Y. y Kirsch, J.F. (2007). Identification of functional paralog shift mutations: Conversi3n of *Escherichia coli* malate dehydrogenase to a lactate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:17353-17357.

Yoshida, A. (1965). Enzymatic properties of lactate dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Acta.* 99:66 77.

Yumoto, I. e Ikeda, K. (1995). Direct fermentation of starch to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. *Biotechnol. Lett.* 17:543-546.

Zhou, S., Causey, T.B., Hasona, A., Shanmugam, K.T. e Ingram, L.O. (2003). Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:399-407.

## IX. APENDICE

### a) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen de la enzima malato deshidrogenasa

Templado: 2  $\mu$ l  
MDHH6Forw: 1.5  $\mu$ l (45 pmol)  
MDHH6Back: 1  $\mu$ l (45 pmol)  
Buffer de reacción: 10  $\mu$ l  
Magnesio: 6  $\mu$ l  
dNTPs (10x): 10  $\mu$ l  
Taq Polimerasa: 4  $\mu$ l  
Agua: 65.5  $\mu$ l  
Volumen total: 100  $\mu$ l

#### Tiempos de reacción

No. de ciclos	Temperatura	Tiempo de reacción
1	94°C	10 minutos
5	94°C, 40°C, 72°C	1 minuto por reacción
15	94°C, 55°C, 72°C	1 minuto por reacción
1	72°C	10 minutos

### b) Purificación de producto de PCR (Kit Roche)

1. Añadir 500  $\mu$ l de buffer de unión
2. Pasar a columnas
3. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm, desechar el sobrenadante
4. Añadir 800  $\mu$ l de la solución de lavado
5. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm, desechar el sobrenadante
6. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm
7. Pasar el sobrenadante a un tubo Eppendorf
8. Añadir 100  $\mu$ l de agua
9. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm

**c) Digestión con enzimas de restricción NcoI-HindIII**

1. Usar 50  $\mu$ l de DNA
2. Añadir 10  $\mu$ l de la siguiente mezcla:
  - a) 36  $\mu$ l de buffer del buffer correspondiente según las recomendaciones del fabricante (New England Biolabs Inc.)
  - b) 14  $\mu$ l de agua estéril
  - c) 6  $\mu$ l de la enzima NcoI
  - d) 6  $\mu$ l de la enzima HindIII
3. Centrifugar 10 segundos a 13000 rpm
4. Incubar toda la noche a 37°C (no emplear gradilla)
5. Purificar como se indica para el producto de PCR
6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%

**d) Ligación en vector pTrc99-A**

1. Entre 8 y 15  $\mu$ l de DNA digerido, según la cantidad de éste.
2. 2  $\mu$ l del vector pTrc99-A
3. 2  $\mu$ l de buffer para ligasa
4. Entre 0 y 7  $\mu$ l de agua para un volumen final de 20  $\mu$ l
5. 1  $\mu$ l de ligasa
6. Dejar incubando 2 horas a temperatura ambiente
7. Añadir 500  $\mu$ l de butanol
8. Aplicar vórtex unos segundos
9. Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm
10. Escurrir y secar 15 minutos en una centrifuga al vacío
11. Añadir 10  $\mu$ l de agua estéril

**e) Transformación de células electrocompetentes Val23**

1. En un tubo añadir:
  - i) 15  $\mu$ l de células electrocompetentes Val23
  - ii) 2  $\mu$ l de la mezcla de ligación correspondiente
  - iii) 40  $\mu$ l de glicerol al 10% estéril
2. Trasladar la mezcla a una cubeta de electroporación
3. Insertar la cubeta en un electroporador y aplicar una descarga eléctrica de 1.6 kV
4. Resuspender en 1 ml de medio LB
5. Incubar con agitación 1 hora a 37°C
6. Plaquesear entre 50 y 200  $\mu$ l en cajas de Petri con LB mas el marcador de selección correspondiente

**f) Purificación de proteínas mediante la técnica de cromatografía de afinidad para proteínas con colas de histidina**

1. Preparar un cultivo de células en 2 ml de medio LB mas el marcador de selección correspondiente
2. Incubar con agitación por 6 horas a 37 °C
3. Trasladar el cultivo a un matraz con 100 ml de medio LB con el marcador de selección correspondiente mas 0.1 mM de IPTG si es el caso (12  $\mu$ l)
4. Incubar con agitación 24 horas a 37 °C
5. Centrifugar el cultivo 30 minutos a 4000 rpm
6. Desechar el sobrenadante
7. Resuspender las células en 4 ml de buffer de unión
8. Sonicar las células: repartir el producto en 10 tubos eppendorf con 400  $\mu$ l cada uno y sonicar cada uno 10 veces por 15 segundos, dejando un intervalo de 3 minutos en hielo para cada uno.

9. Centrifugar 30 minutos a 10,000 rpm a 4 °C
10. Trasladar el sobrenadante a un tubo limpio
11. Preparar la columna de cromatografía y añadir 1 ml de resina
12. Lavar con 3 ml de agua estéril
13. Lavar con 5 ml de buffer de níquel 50 mM
14. Lavar con 3 ml de buffer de unión
15. Cargar el contenido celular en la columna
16. Lavar con 10 ml de buffer de unión
17. Lavar con 6 ml de buffer de lavado
18. Eluir con 2 ml de buffer de elución
19. Después de 8 gotas, tapar la columna y esperar 5 minutos
20. Destapar la columna y tomar fracciones de 250  $\mu$ l de la columna de elución.
21. Medir actividad enzimática de cada fracción usando 0.5  $\mu$ l de proteína en una concentración de sustrato donde se pueda observar actividad.
22. Con el objeto de quitar el imidazol a la proteína aquellas fracciones que presenten mayor actividad juntarlas en un tubo Amicon y añadir 500  $\mu$ l de buffer fosfatos 50 mM pH 7.0
23. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos
24. Añadir 1 ml de buffer fosfatos 50 mM pH 7.0 y centrifugar a 4000 rpm durante 2 minutos; repetir esta operación 4 veces.
25. Almacenar en un tubo eppendorf a 10 °C