



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización bioquímica de una
quimera activa de Shikimato
deshidrogenasa**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GUSTAVO TAPIA URZÚA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. LORENZO PATRICK SEGOVIA FORCELLA
(2016)**

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
Tapia
Urzúa
Gustavo
5554071887
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
409490389
2. Datos del tutor
Dr
Lorenzo Patrick
Segovia
Forcella
3. Datos del sinodal 1
Dr
Víctor Manuel
Valdés
López
4. Datos del sinodal 2
Dr
José Luis
Puente
García
5. Datos del sinodal 3
Dra
Laura
Kawasaki
Watanabe
6. Datos del sinodal 4
Dra
Angélica María
Pablo
Velázquez
7. Datos del trabajo escrito
Caracterización bioquímica de una
quimera activa de Shikimato deshidrogenasa
50 p
2016

“We have formerly seen that parts many times repeated are eminently liable to vary in number and structure; consequently it is quite probable that natural selection, during the long-continued course of modification, should have seized on a certain number of the primordially similar elements, many times repeated, and have adapted them to the most diverse purposes.”

On The Origin of Species (1859), Charles R. Darwin

ÍNDICE

1	Prefacio	2
2	Introducción	3
2.1	Modelo de Evolución Natural: Proteínas	3
2.2	Ingeniería de Proteínas: Recombinación de Dominios	5
2.3	Modelo de Estudio: Shikimato Deshidrogenasa	8
3	Antecedentes	13
4	Hipótesis.....	16
5	Objetivos	16
6	Material y Métodos.....	17
6.1	Cepas Utilizadas	17
6.2	Lista de Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de pcr, secuenciación y mutagénesis	17
6.3	Plásmidos	18
6.4	Construcción de los Vectores de Expresión	18
6.5	Mutagénesis Sitio Dirigida.....	22
6.6	Secuencias de aminoácidos de las enzimas estudiadas.....	23
6.7	Expresión de las Proteínas Recombinantes	24
6.7.1	Con el Vector pT4	24
6.7.2	Con el Vector pHCMC05.....	24
6.8	Purificación de Proteínas.....	26
6.9	Ensayos in Vitro de Actividad Enzimática.....	26
7	Resultados y Discusión	27
8	Conclusiones.....	37
9	Perspectivas	38
10	Bibliografía	39

ABREVIATURAS

AmDH: amina deshidrogenasa.

L-AmDH: leucina amina deshidrogenasa.

F-AmDH: fenilalanina amina deshidrogenasa.

SDH: shikimato deshidrogenasa.

AroE: shikimato deshidrogenasa de *E. coli*.

AroBS: shikimato deshidrogenasa de *B. subtilis*.

E. coli: *Escherichia coli*.

B. subtilis: *Bacillus subtilis*.

YdiB: quinato/shikimato deshidrogenasa.

O/N: overnight.

Kan: kanamicina.

OD: densidad óptica.

Cam: cloranfenicol.

Amp: ampicilina

LB: medio Luria-Beltrani.

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido.

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo natural de evolución de proteínas. La duplicación y fusión de genes o segmentos de estos pueden llegar a producir proteínas de varios dominios, los cuales en el curso de tiempo evolutivo pueden recombinarse entre ellos y obtener novedades funcionales y estructurales (Modificada de Höcker *et al.*, 2004)..... 4
- Figura 2.** Vía del shikimato. Ruta metabólica en la que participa AroE, cuyo producto final es corismato. El cuarto paso de la vía es la reducción dependiente de NADPH de DHS a shikimato (cuadro punteado) y es catalizado por AroE. Las abreviaciones utilizadas para representar a los intermediarios son: PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrosa-4-fosfato; DAHP, 3-deoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato; DHQ, dehidroquinato; DHS, dehidroshikimato; S3P, shikimato-3-fosfato; EPSP, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato. Las abreviaciones utilizadas para las enzimas son: DAHPS, 3-deoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato sintasa; DHQS, dehidroquinato sintasa; DHQD, dehidroquinato deshidratasa; SDH, shikimato deshidrogenasa; SK, shikimato cinasa; EPSPS, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa; CS, corismato sintasa (Modificada de Peek & Christendat, 2015). 8
- Figura 3.** Diversidad de compuestos utilizados por la familia de proteínas SDH. (A) Shikimato, producto de la reacción catalizada *in vivo* por AroE; (B) quinato, sustrato de YdiB; (C) aminoshikimato, el sustrato preferencial de Rifi; (D) aminoquinato, sustrato alternativo de Rifi; (E) dihidroshikimato y (F) 3,4-dihidroxiciclohexanocaboxilato, posibles sustratos de Ael1 (Tomada de Peek & Christendat, 2015). 9
- Figura 4.** Representación de la estructura de SDH de *E. coli* (AroE). Se muestran las hélices α en amarillo, las hojas β en verde y el cofactor NADP⁺ en bastones (Tomada de Michel *et al.*, 2003)... 10
- Figura 5.** Topología clásica del plegamiento Rossmann. Los rectángulos representan hélices α y los rectángulos a las hojas β . En círculos se muestran los tres residuos de glicina conservados, importantes en el reconocimiento del cofactor y empaquetamiento del dominio (Tomada de Bottoms *et al.*, 2002)..... 11
- Figura 6.** Sitios de recombinación en enzimas parentales (A-B) y quimeras (C-D). Representación de las quimeras generadas a partir de la recombinación de AroE y AroBS. Los colores de los segmentos indican la enzima de la cual proceden: AroE, rojo; AroBS, verde. El dominio Rossmann de cada enzima se representa en un color atenuado. La proteína objeto de este estudio (C. EBE) se encuadra con líneas punteadas..... 14
- Figura 7.** Mapas de vectores utilizados..... 19
- Figura 8.** AroBS amplificado de DNA genómico de *B. subtilis*..... 20
- Figura 9.** Plásmido pHCMC05 e inserto AroBS digeridos y purificados. 20
- Figura 10.** Digestión de pHCMC05-AroBS con HindIII para comprobar la clonación..... 21

Figura 11. Expresión de las proteínas EBE, AroBS y AroE. Western blot anti-6xHis, de izquierda a derecha: MPM, marcador de peso molecular; carril 1, EBE soluble; carril 2, EBE insoluble; carril 3, AroBS soluble; carril 4, AroBS insoluble; carril 5, AroE soluble. Para las fracciones solubles se cargaron 50 µg de extracto proteico en el gel de electroforesis y para las fracciones insolubles se resuspendieron los pellets correspondientes a 5 mL de cultivo en 0.5 mL de buffer de Carga de Proteínas 4X y se cargaron 20 µL. 27

Figura 12. Ensayos de expresión en cepas Rosetta C41, C43 y RI. (A) Tinción con azul de Coomassie de extractos proteicos. (B) Western blot anti-6xHis de extractos proteicos. Carril 1, C43 AroE.His; carril 2, RI AroE.His; carril 3, C41 AroBS.His; carril 4, C43 AroBS.His; carril 5, RI AroBS.His; carril 6, C43 EBE.His; carril 7, RI EBE.His..... 28

Figura 13. PCR de Colonia de AroBS.His en *B. subtilis* 168 transformadas con la construcción pHCMC05-AroBS.His. Carril 1, AroBS.His amplificados de pT4-AroBS.His; carril 2, NTC; carril 3, AroBS.His amplificado de colonia de *B. subtilis* 168 transformada con pHCMC05-AroBS.His. 29

Figura 14. Ensayos de expresión de AroBS.His con el vector pHCMC05 en *B. subtilis* 168. MPM, marcador de peso molecular; carril 1 – carril 4, 0.5 mM IPTG t_0 , t_{60} , t_{120} , t_{160} (respectivamente); carril 5 – carril 7, 1 mM IPTG t_{60} , t_{120} , t_{160} (respectivamente); carril 8, control EBE.His pura. El tiempo se reporta en minutos después de la inducción con IPTG..... 29

Figura 15. Ensayos de expresión de AroBS (s/6xHis) con pHCMC05 en *B. subtilis* 168. MPM, marcador de peso molecular; carril 1, *B. subtilis* 168 sin transformar; carril 2, AroBS sin inducir; carril 3, 0.5 mM IPTG t_{30} ; carril 4, 1 mM IPTG t_{30} ; carril 5, 0.5 mM IPTG t_{60} ; carril 6, 1 mM IPTG t_{60} ; carril 7, AroBS sin inducir; carril 8, 0.5 mM IPTG t_{90} ; carril 9, 1 mM IPTG t_{90} . El tiempo se reporta en minutos después de la inducción IPTG. 30

Figura 16. Purificación de AroE.His y EBE.His. (A) Purificación AroE.His. Carril 1, extracto crudo; carril 2-7, lavados con 75 mM imidazol; carril 8-13, elución AroE.His con 250 mM imidazol. (B) Ensayo de purificación EBE.His. Carril 1, extracto crudo (a partir de 500 mL de cultivo); carril 2-7, lavados con 75, 100, 200 y 300 mM imidazol; carril 8, AroE.His pura. (C) Western blot anti-6xHis. Carril 1, AroE.His pura; Carril 2, extracto crudo EBE.His (a partir de 500 mL de cultivo). (D) Purificación de EBE.His. Carril 1, extracto crudo; carril 2, extracto crudo después de pasarlo por columna HisTrap; carril 3-5, lavados con 35 mM imidazol (50 mL buffer de lavado c/u); carriles 6-7, elución EBE.His con 75 mM imidazol; carril 8-9, elución EBE.His con 250 mM imidazol (5 mL de buffer de elución recolectados en muestras de carriles 6-8 y 15 mL para carril 9). (E) Enzimas puras para ensayos de actividad enzimática. Carril 1, extracto crudo AroE.His; carril 2, AroE. His pura; carril 3, extracto crudo EBE.His; carril 4, EBE.His pura. Abreviaturas: MPM, marcador de peso molecular..... 32

Figura 17. Cinéticas de actividad específica de las enzimas AroE y EBE ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten. Actividades específicas medidas en concentraciones variables de sustrato (Shikimato) o cofactor (NADP^+) mientras la concentración del otro se mantenía en un nivel de saturación constante. La actividad enzimática se midió catalizando la reacción inversa de SDH a 25°C en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 9.0. La reacción catalizada por AroE y EBE fue monitoreada en su fase inicial por la absorbancia a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.18 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). (A) – (D) Shikimato como sustrato

variable (62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 μM en A, C y D; 100, 150, 250, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000 y 4000 μM en B) mientras el NADP⁺ se mantenía en concentración saturante (1000 μM). (E) – (H) NADP⁺ como sustrato variable (31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 μM) mientras el Shikimato se mantenía en concentración saturante (4000 μM). Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima catalizando la conversión de 1 μmol de NADP⁺ por minuto a 25°C. 34

Figura 18. Posición e importancia del residuo 100 en la estructura de AroE. (A) Posición teórica del residuo His¹⁰⁰ en AroE con mutación N100H. (B) Posición del residuo Asn¹⁰⁰ en AroE con mutación revertida. Asn¹⁰⁰ se encuentra en los límites del dominio N-terminal y el conector con el dominio Rossmann, entre la hoja β_6 y la hélice α_5 . Este residuo se encuentra altamente conservado en la familia SDH y también se encuentra inmediato a los residuos 100% conservados Thr¹⁰¹ y Asp¹⁰². Asn¹⁰⁰ y Asp¹⁰² se encuentran expuestos hacia el sitio de unión a sustrato (Ye et al. 2003) por lo que podrían estar participando directamente en ello. Thr¹⁰¹ participa en la formación de una red de puentes de hidrógeno en el conector entre el dominio N-terminal y el dominio Rossmann. Dicha red es importante en la función de bisagra de esta región, la cual permite el cambio de conformación abierta a cerrada una vez que se ha unido el sustrato y con ello la formación de un sitio activo productivo (Michel et al. 2003). Se muestra en rojo la hoja β_6 , hélice α_5 y los residuos que las conectan. En esferas se representa al cofactor NADPH. Modelos creados en SWISS-MODEL..... 35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas utilizadas.	17
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados.	17
Tabla 3. Parámetros cinéticos aparentes de la enzima parental AroE y la quimera EBE.	33

RESUMEN

La recombinación de proteínas homólogas es una estrategia recurrente; la cual, después de rondas de selección resulta en la optimización del plegamiento, estructura y/o funciones enzimáticas. En el laboratorio se combinaron anteriormente los dominios de las shikimato deshidrogenasas de *E. coli* (AroE) y *B. subtilis* (AroBS), proteínas que tienen 35% de identidad de secuencia; produciendo una quimera plegable y activa.

La quimera activa está formada por las secuencias de aminoácidos M1-T101 de AroE, el dominio Rossmann (D102-D241) de AroBS y las hélices $\alpha 9$ y $\alpha 10$ (G237-S271) del dominio catalítico de AroE; por ello a la quimera se le llamó EBE, haciendo referencia al orden y el origen de los fragmentos combinados. Las enzimas AroE y EBE del laboratorio presentaban una sustitución en el dominio N-terminal de una histidina por una asparagina en el residuo 100 (N100H) respecto a la secuencia reportada de AroE.

Los valores enzimáticos de AroE_{N100H} y EBE_{N100H} estaban muy por debajo de los reportados para AroE. Sin embargo, una vez revertida la mutación AroE y EBE incrementaron su actividad catalítica y su afinidad por shikimato. Este trabajo demostró que intercambiar el dominio Rossmann de proteínas homólogas puede generar enzimas activas. Además se mostró la importancia del residuo N100 en el reconocimiento del sustrato y la actividad de shikimato deshidrogenasa.

1 PREFACIO

La naturaleza es un artesano y no un inventor

Los inventores buscan y utilizan el material necesario para construir el objeto que desean, los artesanos trabajan con lo que tienen a la mano para producir un objeto, asignando nuevas funciones al material que utilizan. La naturaleza opera como un artesano porque no produce novedades de la nada, lo hace combinando lo ya existente, asignándole nuevas funciones a través de procesos de selección (Jacob, 1977).

Desde la antigüedad los seres humanos hemos observado nuestro entorno, y gracias a ello nos hemos percatado de que la variedad de formas existentes en los seres vivos no son más que la combinación de ciertas formas básicas, más simples. Las distintas civilizaciones que han poblado la tierra crearon, utilizando este concepto de combinación de formas, seres fantásticos que poseían lo más bello o lo más temible de los animales que ya habían observado.

En la naturaleza los distintos organismos, tejidos, células y macromoléculas que existen son el resultado del ordenamiento y combinación de unidades y/o estructuras que les precedieron. Si se intentara predecir el fenotipo que un mamífero podría presentar después de un millón de años de evolución bajo ciertas condiciones ambientales, dicho fenotipo constaría de una suma de características que ya hemos observado en especies que se han adaptado a nichos más o menos similares (Jacob, 1977).

2 INTRODUCCIÓN

Las proteínas constituyen el 50% del peso seco de los seres vivos y además de presentar funciones estructurales para las células y tejidos; algunas de ellas, las enzimas, funcionan como las máquinas moleculares que llevan a cabo todas las reacciones necesarias para el metabolismo celular. Muchos de los productos que se obtienen por la acción de las enzimas se han vuelto de importancia farmacéutica, alimenticia e industrial.

Por lo tanto, existe un interés por estudiar cuál es la relación estructura-función y con ello conocer si es posible modificar su estructura para obtener enzimas más eficientes. A través de varias décadas de estudio se ha encontrado que las enzimas que llevan a cabo reacciones del mismo tipo pueden presentar dominios proteicos similares; es decir, existen dominios que han evolucionado y se han conservado para realizar funciones determinadas.

Imitando lo que sucede en la naturaleza, se ha intentado generar proteínas con mayor afinidad, velocidad y estabilidad, o con funciones totalmente nuevas, a través del intercambio de dominios de proteínas homólogas. A estas proteínas generadas en el laboratorio se les conoce como quimeras. La construcción de quimeras permite estudiar además la importancia evolutiva de los dominios en la relación estructura-función de una proteína.

En el presente trabajo se describe la función enzimática de una quimera generada a partir de la recombinación de dominios de la shikimato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.25) de *Escherichia coli* (AroE) y de *Bacillus subtilis* (que para distinguirla se denominará AroBS en el presente trabajo).

2.1 MODELO DE EVOLUCIÓN NATURAL: PROTEÍNAS

El re-ordenamiento de estructuras se puede observar desde niveles inferiores de organización de la materia, como lo es el nivel molecular. Por ejemplo: los genes que existen en la actualidad son el producto de la duplicación, divergencia y reordenamiento de segmentos que sufrieron los genes de las primeras formas de vida (Taylor & Raes, 2004; Bashton & Chothia, 2007) , incluso hay quien sugiere que sin la duplicación génica hubiera sido imposible la evolución de organismos unicelulares hacia pluricelulares (Ohno, 1970).

En los genes codificantes para proteínas, dichos segmentos constituyen unidades funcionales y de plegamiento independientes conocidas como dominios, los cuales tienen más interacciones físico-

químicas dentro de sí mismos que con el resto de la cadena polipeptídica (Janin & Wodak, 1983). Un dominio se define aquí evolutivamente como la parte de la proteína que tiene una historia independiente con respecto al resto del polipéptido (Ponting & Russell, 2002).

La naturaleza modular de estos dominios permite el surgimiento de nuevas y complejas funciones a partir del intercambio de un número limitado de dominios (Han *et al.*, 2007), por ello son considerados la unidad evolutiva de las proteínas (Vogel *et al.*, 2004; Wang & Caetano-Anollés, 2009).

Un modelo natural de evolución incluiría un gen A que produce una proteína A con una función determinada. Si el gen A se duplica, el nuevo segmento puede sufrir mutaciones y adquirir una nueva función, y no por ello repercutir en la eficiencia del organismo, ya que existe otra copia que sigue cumpliendo con la función original. Si los dos segmentos se fusionan y optimizan su interacción, pueden crear una proteína bidominio ($A^* - A$), en la que cada dominio aporta su función específica para llevar a cabo un nuevo proceso. Esta región a su vez, puede duplicarse y evolucionar de manera independiente ($B^* - B$), y posteriormente recombinar sus dominios con los de la proteína inicial ($A^* - B$, $B^* - A$) (Höcker *et al.*, 2004) (Figura 1).

En el ejemplo descrito, las proteínas $A^* - A$ y $B^* - B$ son homólogas entre sí y el intercambio de dominios (A por B y viceversa) genera proteínas funcionales porque la similitud entre los dominios facilita la formación de una interface adecuada y probablemente un plegamiento parecido. La recombinación de dominios entre proteínas homólogas ha sido una forma de evolución recurrente que ha resultado en la optimización del plegamiento, estructura y/o funciones proteicas (Bashton & Chothia, 2007).

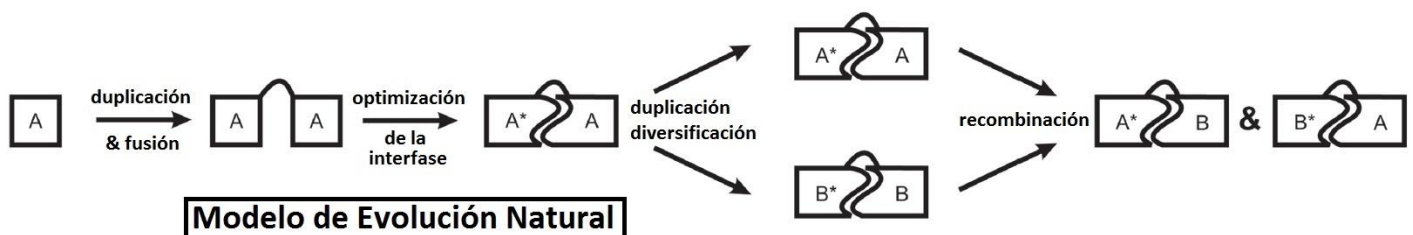


Figura 1. Modelo natural de evolución de proteínas. La duplicación y fusión de genes o segmentos de éstos pueden llegar a producir proteínas de varios dominios, los cuales en el curso de tiempo evolutivo pueden recombinarse entre ellos y obtener novedades funcionales y estructurales (Modificada de Höcker *et al.*, 2004).

El estudio de la evolución de proteínas se ha centrado principalmente en los mecanismos de duplicación y divergencia de secuencia de genes; sin embargo, poco se ha profundizado en el papel

de la combinación de segmentos de genes para la generación de proteínas multidominio (Bashton & Chothia, 2007). Esta área adquiere una gran relevancia en el diseño de proteínas con funciones particulares ya que se pueden utilizar los dominios como materia prima para imitar lo que sucede en la naturaleza y obtener, por ejemplo, enzimas que catalicen reacciones específicas, utilicen distintos sustratos/cofactores o tengan una mayor eficiencia catalítica.

Bashton & Chonthia (2007) hacen una analogía a la forma en que el intercambio de dominios genera proteínas funcionales. Una proteína multidominio es como un conjunto de palabras formando una oración, sólo si las palabras correctas se encuentran en un orden determinado, una oración tiene coherencia y sentido. La probabilidad de que al mezclar palabras al azar obtengamos una oración coherente es muy baja, pero modificando la sintaxis de éstas se pueden generar oraciones que presentan una idea. Así, los dominios constituyen las palabras de las proteínas y sólo después de rondas de corrección de sintaxis (*i.e.*, diversificación) se pueden obtener proteínas coherentes y funcionales.

2.2 INGENIERÍA DE PROTEÍNAS: RECOMBINACIÓN DE DOMINIOS

En la naturaleza, la formación de proteínas multidominio ocurre por eventos de re-organización génica como transferencia horizontal, duplicación génica y fusión de fragmentos. En la ingeniería de proteínas se han diseñado métodos para replicar lo que ocurre de manera natural, generándose proteínas quiméricas; es decir, híbridos de proteína formados por la sustitución de fragmentos entre dos proteínas parentales, los cuales van de pequeños péptidos hasta dominios enteros (Shanmugaratnam *et al.*, 2012).

En distintos grupos de investigación, incluido el del Dr. Lorenzo Segovia, se ha intentado mimetizar la evolución de proteínas mediante recombinación de dominios; a continuación se describen algunos ejemplos en los cuales la recombinación generó quimeras funcionales. Posteriormente se describe el modelo de estudio que se ha empleado en el laboratorio del Dr. Segovia para el estudio de la recombinación de dominios.

Kataoka *et al.* (1994), estudiaron el mecanismo de reconocimiento específico de sustratos a partir del intercambio de dominios de la fenilalanina deshidrogenasa de *Thermoactinomyces intermedius* y la leucina deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus*, las cuales presentan un 47 % de similitud de secuencia. La fenilalanina deshidrogenasa tiene preferencia por L-fenilalanina y L-tirosina, mientras que la leucina deshidrogenasa por L-leucina y algunos L-aminoácidos ramificados.

En ambas enzimas el extremo N-terminal es el encargado de unir al sustrato y el C-terminal une al cofactor NAD^+ , al intercambiar estos dominios se generaron dos quimeras. La correspondiente al dominio N-terminal de leucina deshidrogenasa y C-terminal de fenilalanina deshidrogenasa no logró expresarse. Por el contrario, la quimera con la combinación de dominios N-terminal y C-terminal de fenilalanina y leucina deshidrogenasa, respectivamente se expresó y tuvo K_m similares por L-fenilalanina y L-tirosina a las reportadas para la fenilalanina deshidrogenasa parental. Sin embargo, la eficiencia catalítica de la quimera fue mucho menor a la de la fenilalanina deshidrogenasa. Por lo tanto, los dominios de las dos aminoácido deshidrogenasas tienen plegamiento y función autónomas involucrados en la unión de sustrato y coenzima. Además, la quimera tuvo mayor eficiencia al utilizar isoleucina o valina como sustratos, al compararla con la eficiencia de la fenilalanina deshidrogenasa utilizando estos sustratos. La especificidad por sustrato de la quimera en la deaminación reductiva fue la mezcla aditiva de la que presentan las enzimas parentales. Con lo anterior se concluye que cada dominio de la quimera interactúa y se comunica con el otro para formar el nuevo sitio activo y consecuentemente mostrar una nueva especificidad por sustrato; es decir, la especificidad de sustrato de las aminoácido deshidrogenasas puede estar determinada por la interacción estructural de los dos dominios (Kataoka *et al.*, 1994).

Bommarius *et al.* (2014) construyeron una quimera a partir de amina deshidrogenasas que, además de mantener la especificidad por sustrato de su enzima parental mejor caracterizada, tiene la capacidad de reconocer nuevos sustratos. Las amina deshidrogenasas (AmDH): Leucina-AmDH y Fenilalanina-AmDH fueron las enzimas parentales utilizadas. L-AmDH y F-AmDH fueron desarrolladas en el laboratorio de Bommarius (Abrahamson *et al.*, 2012; Abrahamson *et al.*, 2013) a partir de leucina y fenilalanina deshidrogenasa; con la finalidad de catalizar la aminación directa de cetonas con NH_3 . La quimera generada contiene el dominio de unión a cetonas/aminas de F-AmDH y el dominio de unión a cofactor de L-AmDH y se nombró cFL1-AmDH. La quimera cFL1-AmDH acepta y convierte sustratos no reconocidos por la enzima parental F-AmDH como: acetofenona, adamantilmetilmetilcetina y metoxiacetona. Por lo tanto, concluyeron que el dominio de unión a cofactor de las deshidrogenasas puede jugar un papel importante en la especificidad a sustrato, reestructurando y extendiendo el sitio de reconocimiento al sustrato para permitir la conversión de moléculas con distintas características (alifáticas, aromáticas y cetonas grandes). Al realizar la caracterización enzimática de la quimera, su valor de K_m aparente por pFPA y NH_3 se había reducido en comparación con el de la enzima parental F-AmDH; sin embargo, también se redujeron los valores de k_{cat} . La comparación de secuencias de aminoácido deshidrogenasas reveló que las

asparaginas N270 y N271 de la quimera tienen un papel en la aminación; para comprobarlo se mutaron estos residuos hacia leucinas en cFL1-AmDH, creando la quimera cFL2-AmDH. Los resultados fueron un aumento en el valor aparente de k_{cat} para pFPA y NH_3 , pero una reducción en su K_m . cFL2-AmDH mostró también K_m y k_{cat} aparentes menores para acetofenona en comparación con los valores obtenidos con cFL1-AmDH. Lo anterior muestra que una vez modificada la especificidad por sustratos con el intercambio de dominios, la proteína quimera se puede mejorar hacia un sustrato en particular realizando mutaciones puntuales. Los autores concluyen que (i) el dominio de unión a cofactor en las amina deshidrogenasas tiene también un papel importante en el reconocimiento de sustratos y que (ii) el barajeo de dominios puede alterar la especificidad por sustrato de la quimera respecto al calculado para las enzimas parentales (Bommarius *et al.*, 2014).

2.3 MODELO DE ESTUDIO: SHIKIMATO DESHIDROGENASA

Función

La shikimato deshidrogenasa (AroE) es una enzima que participa en la vía del shikimato de microorganismos, plantas y hongos (Herrmann & Weaver 1999). Esta vía tiene como producto final la formación de corismato, el cual es precursor común en la biosíntesis de compuestos aromáticos como las vitaminas K₁ y B₉, y los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano (Figura 2) (Cotton & Gibson, 1965). AroE participa en la cuarta reacción de la vía del shikimato de *E. coli*, catalizando la reducción reversible de 3-dehidroshikimato a shikimato (Pittard & Wallace, 1966).

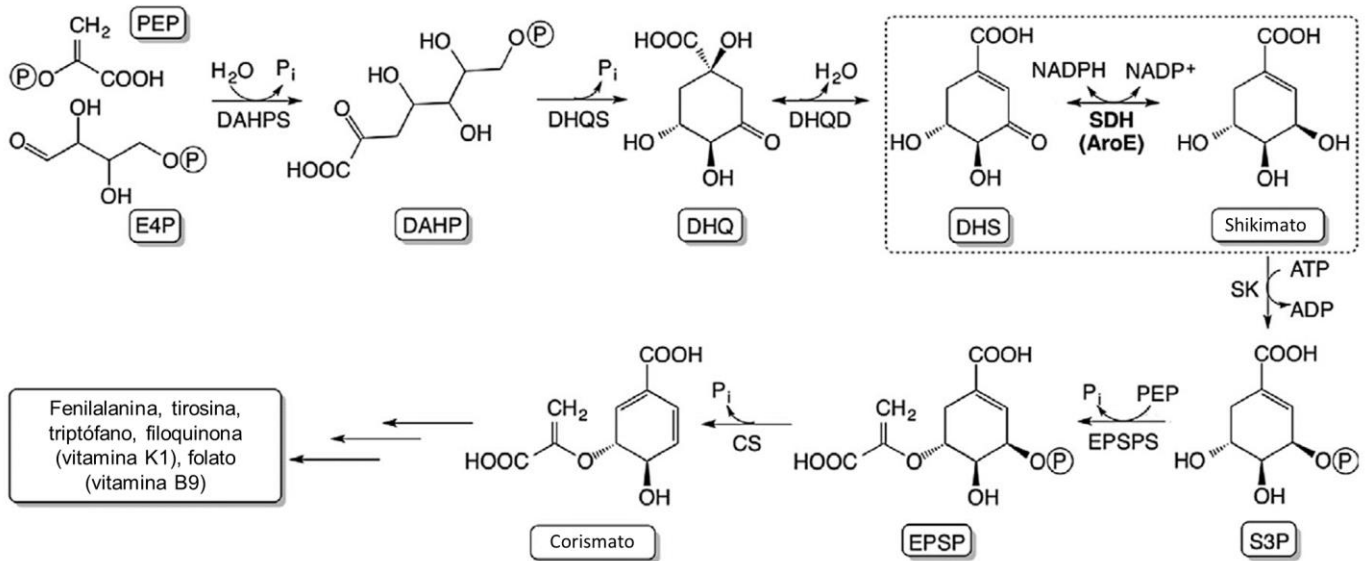


Figura 2. Vía del shikimato. Ruta metabólica en la que participa AroE, cuyo producto final es corismato. El cuarto paso de la vía es la reducción dependiente de NADPH de DHS a shikimato (cuadro punteado) y es catalizado por AroE. Las abreviaciones utilizadas para representar a los intermediarios son: PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrosa-4-fosfato; DAHP, 3-deoxi-D-arabinoheptulosa-7-fosfato; DHQ, dehidroquinato; DHS, dehidroshikimato; S3P, shikimato-3-fosfato; EPSP, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato. Las abreviaciones utilizadas para las enzimas son: DAHPS, 3-deoxi-D-arabinoheptulosa-7-fosfato sintasa; DHQS, dehidroquinato sintasa; DHQD, dehidroquinato deshidratasa; SDH, shikimato deshidrogenasa; SK, shikimato cinasa; EPSPS, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa; CS, corismato sintasa (Modificada de Peek & Christendat, 2015).

Existen cuatro enzimas que han sido relacionadas evolutivamente con AroE por presentar estructuras tridimensionales similares y poseer de 20% a 50% de identidad de secuencia; por ello han sido clasificadas como proteínas de la familia SDH (shikimato deshidrogenasa). Las enzimas que componen la familia SDH son: shikimato deshidrogenasa (AroE), quinato/shikimato deshidrogenasa (YdiB), aminoshikimato deshidrogenasa (RifI), SDH-like (SdhL) y AroE-like1 (Ael1).

Todas ellas comparten un plegamiento α/β altamente conservado y reconocen moléculas similares al shikimato (Figura 3); sin embargo, presentan variaciones importantes en algunos aminoácidos del sitio activo, lo cual está relacionado con la selectividad que tienen hacia distintos sustratos (Peek & Christendat, 2015).

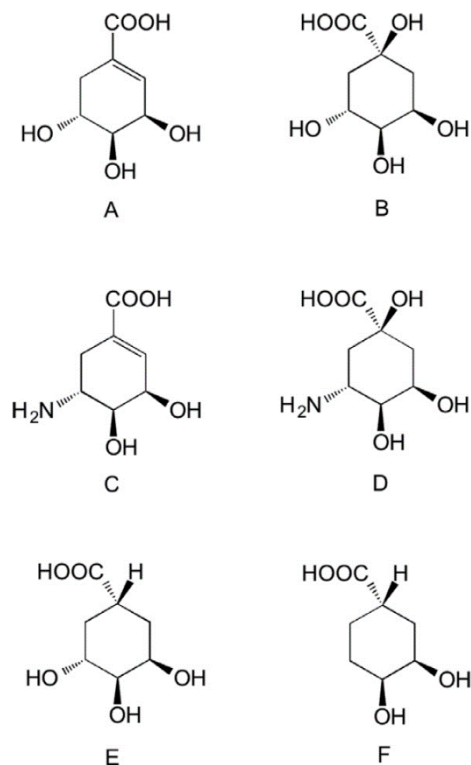


Figura 3. Diversidad de compuestos utilizados por la familia de proteínas SDH. (A) Shikimato, producto de la reacción catalizada *in vivo* por AroE; (B) quinato, sustrato de YdiB; (C) aminoshikimato, el sustrato preferencial de RifI; (D) aminoquinato, sustrato alternativo de RifI; (E) dihidroshikimato y (F) 3,4-dihidroxiciclohexanocaboxilato, posibles sustratos de Ael1 (Tomada de Peek & Christendat, 2015).

Estructura

AroE es una enzima monomérica de 271 aminoácidos con un peso molecular de 29.38 kDa (Anton & Coggins, 1988); mientras que AroBS (AroE de *B. subtilis*) está compuesta por 280 aminoácidos y tiene un peso molecular teórico de 30.6 kDa (Espinosa, 2010). En ambas proteínas se encuentran conservados los residuos identificados como importantes en la unión al sustrato y el cofactor de la reacción en otras SDH (Padyana & Burley, 2003; Ye *et al.*, 2003). No se ha reportado la expresión heteróloga y purificación de AroBS por lo que no se tienen datos experimentales de su plegamiento y los residuos importantes en su función; sin embargo, se puede identificar por su secuencia que comparte los dominios característicos de AroE (Espinosa, 2010). Por el contrario, AroE se ha estudiado ampliamente y sus características se describen a continuación.

La reacción catalizada por AroE es dependiente del cofactor NADPH. Este dinucleótido es reconocido por un dominio con plegamiento Rossmann que estructuralmente (Gly119 – Asp236) se encuentra

interrumpiendo la secuencia de aminoácidos del dominio que reconoce al 3-dehidroshikimato (Met1 – Thr101 y Gly237 – Ser271) (Michel *et al.*, 2003). Este es el tipo de plegamiento tridimensional que caracteriza a todos los miembros de la familia SDH (Figura 4) (Peek *et al.* 2013, 2011; Singh *et al.*, 2005).

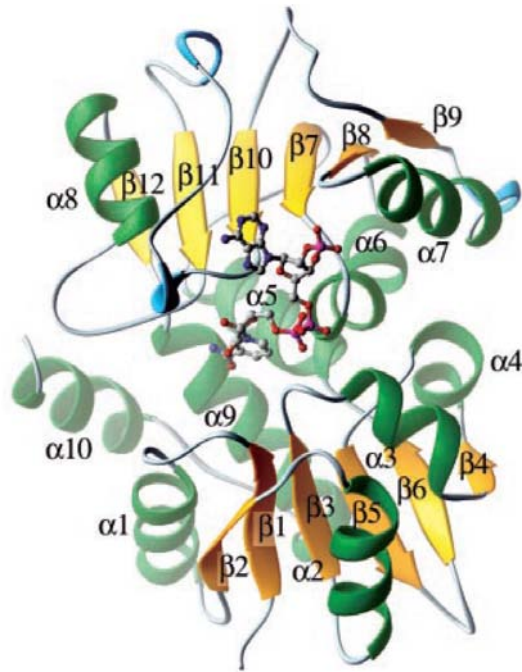


Figura 4. Representación de la estructura de SDH de *E. coli* (AroE). Se muestran las hélices α en amarillo, las hojas β en verde y el cofactor NAD⁺ en bastones (Tomada de Michel *et al.*, 2003).

El dominio N-terminal es el que contiene más aminoácidos involucrados con el reconocimiento al 3-dehidroshikimato y está compuesto por una estructura central de 6 hojas β principalmente paralelas (2-1-3-5-6-4), rodeadas por 6 hélices α (1-2-3-4 y 9-10)¹ (Figura 4). El dominio Rossmann forma parte del dominio C-terminal de AroE y está formado por dos motivos de la forma $\beta\alpha\beta\alpha\beta$; es decir, son 6 hojas β paralelas (9-8-7-10-11-12) con hélices α (6-7-8) a ambos lados, paralelas a las hojas β (Figura 4). El sitio de reacción de la enzima se encuentra en la interfaz de los dos dominios, los cuales están unidos al centro por un par de hélices α , formando una hendidura (Peek & Christendat, 2015).

El plegamiento Rossmann es uno de los más versátiles que existen, y frecuentemente forma parte de deshidrogenasas y reductasas por su capacidad de reconocer coenzimas para el transporte de electrones (NADH, NADPH o FADH₂) (Kallberg & Persson, 2006). El dominio Rossmann se puede

¹ Las hélices $\alpha 9$ y $\alpha 10$ constituyen la cola del dominio C-terminal; sin embargo, se consideran parte del dominio N-terminal porque a nivel de estructura tienen más interacción con los elementos que lo componen que con el plegamiento Rossmann.

combinar con otro dominio Rossmann, como en las glutatión reductasas (Schulz *et al.*, 1978); o puede estar en combinación con dominios de otro tipo de plegamiento, ya sea en el extremo N-terminal, C-terminal, o interrumpiendo alguno de éstos (Brenner *et al.*, 1996), como sucede en AroE (Michael *et al.*, 2003).

La primer parte de un dominio Rossmann canónico ($\beta 1\alpha 1\beta 2$) tiene un papel muy importante en el reconocimiento y unión de FADH₂, NADH o NADPH. La especificidad por una de las coenzimas está dada principalmente por los residuos que se encuentran al final de la cadena $\beta 2$. Si estos están cargados negativamente habrá una preferencia por utilizar FADH₂ o NADH como cofactor, esto porque hay un impedimento estérico para posicionar el 2'-fosfato adicional del NADPH. En su lugar, los dominios que reconocen NADPH normalmente tienen un residuo básico después de la cadena $\beta 2$.

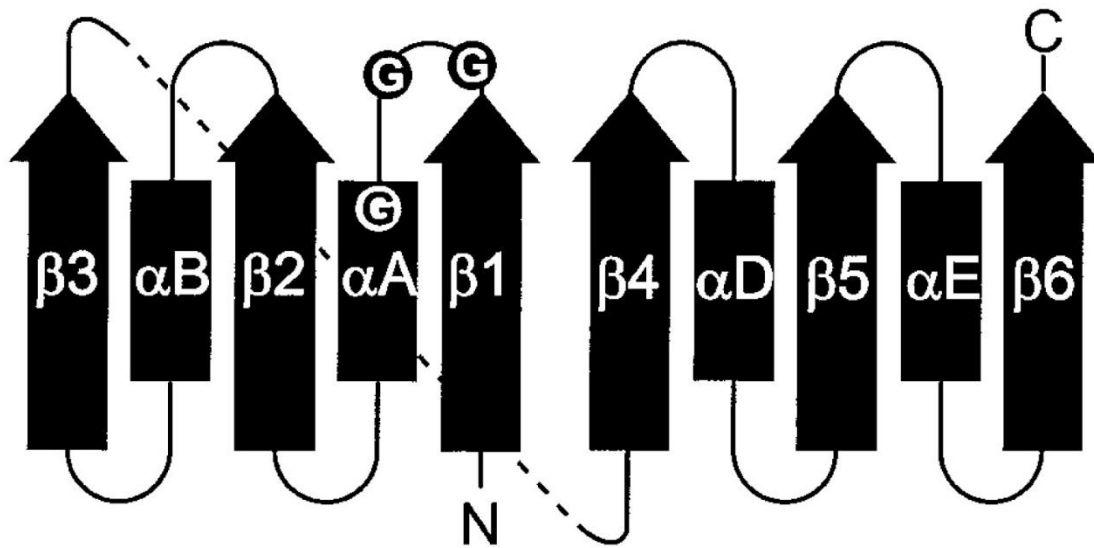


Figura 5. Topología clásica del plegamiento Rossmann. Los rectángulos representan hélices α y los rectángulos a las hojas β . En círculos se muestran los tres residuos de glicina conservados, importantes en el reconocimiento del cofactor y empaquetamiento del dominio (Tomada de Bottoms *et al.*, 2002).

Para la unión del cofactor, existen dos glicinas involucradas, la primera se encuentra al final de la cadena $\beta 1$ y la segunda al principio de la hélice αA (Figura 5). Existe además una tercera glicina en esa región que está relacionada con el empaquetamiento de las cadenas β y la hélice α (Figura 5) (Wierenga *et al.*, 1985). Un residuo básico posicionado antes de la segunda glicina también juega un papel importante en la preferencia de NADPH sobre NADH (Kallberg *et al.*, 2002).

Kallberg y Persson (2006) identificaron alrededor de 9,200 proteínas con plegamiento Rossmann en 68 genomas completos de arqueas, bacterias y eucariontes. Este tipo de proteínas representan el 1% del total de proteínas en un genoma eucarionte y el 3% en procariontes. Además, a pesar de que la mayoría de las proteínas con dominio Rossmann pertenecen a la clase de las oxidoreductasas en humanos, también existen algunas enzimas multifuncionales con dominio Rossmann que pertenecen a las hidrolasas, liasas e isomerasas (Kallberg & Persson, 2006).

Importancia Biotecnológica

La enzima AroE tiene una gran importancia a nivel industrial porque el shikimato es utilizado para la síntesis de oseltamivir (Tamiflu), fármaco utilizado contra el virus de la influenza. Varios estudios han explotado la actividad de AroE en experimentos de ingeniería de rutas metabólicas para optimizar la producción de shikimato en bacterias (Liu *et al.*, 2014a; Adachi *et al.*, 2006a, 2006b; Liu *et al.*, 2014b) y obtenerlo de una forma más rentable que el aislamiento a partir de plantas, como se realiza actualmente.

Dado que el plegamiento Rossmann se ha conservado en un considerable número y clases de enzimas, además de que presenta una gran versatilidad en funciones y secuencia, constituye un dominio interesante para el estudio de la evolución e ingeniería de proteínas.

3 ANTECEDENTES

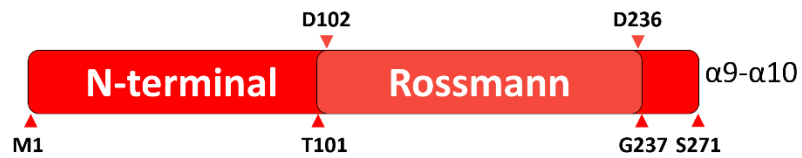
Espinosa (2010) generó cuatro quimeras de shikimato deshidrogenasas recombinando los dominios de AroE de *E. coli* y de *B. subtilis* (AroBS) (en este trabajo me referiré a AroE y AroBS como proteínas parentales). AroE y AroBS son las enzimas con menor porcentaje de identidad de secuencia (35%) que se han utilizado para generar proteínas quiméricas en experimentos de recombinación de dominios de aminoácido deshidrogenasas (Espinosa, 2010).

Las quimeras se nombraron de acuerdo al orden y al número de los segmentos parentales a partir de los cuales fueron construidas y son: EB, BE, EBE y BEB. Las quimeras EB y BE fueron generadas a partir de un solo sitio de recombinación, EB contiene el dominio N-terminal de AroE (M1 – T101) y el dominio C-terminal de AroBS (D102 – C280). Sucede lo inverso en BE, N-terminal de AroBS (M1 – T101) y C-Terminal de AroE (D102 – S271) (Espinosa, 2010).

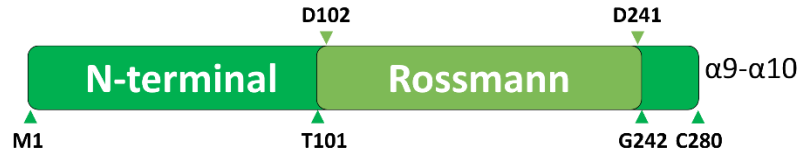
Para la construcción de EBE y BEB se tomó en consideración que el dominio Rossmann se encuentra interrumpiendo la secuencia del dominio que reconoce al shikimato. Se utilizaron entonces dos sitios de recombinación, el primero (T101) para intercambiar el conector (hélice α 5) y el dominio Rossmann; y el segundo (G237 en AroE y G242 en AroBS) para intercambiar la cola C-terminal con las hélices α 9 y α 10. De forma que EBE está formada por el dominio N-terminal y cola C-terminal de AroE (M1 – T101 y G237 – S271, respectivamente), y el dominio Rossmann de AroBS (D102 – D241) (Figura 6C). Mientras que BEB contiene el dominio N-terminal y cola C-terminal de AroBS (M1 – T101 y G242 – D280, respectivamente), y el Rossmann de AroE (D102 – D236) (Figura 6D) (Espinosa, 2010).

De las cuatro construcciones generadas sólo pudo comprobarse la expresión y actividad *in vivo* de la quimera EBE. La expresión se comprobó por *western blot* contra una cola de 6 histidinas unidas al final de la secuencia C-terminal de la proteína. La actividad *in vivo* se comprobó con ensayos de complementación de la cepa de *E. coli* (BW25113) sin el gen *aroE* (Δ aroE) en medio mínimo sin aminoácidos aromáticos (Espinosa, 2010).

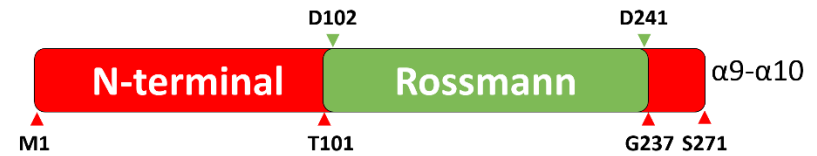
A. AroE



B. AroBS



C. EBE



D. BEB

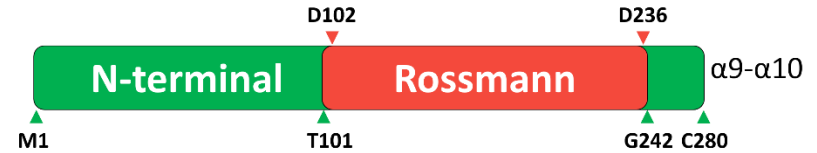


Figura 6. Sitios de recombinación en enzimas parentales (A-B) y quimeras (C-D). Representación de las quimeras generadas a partir de la recombinación de AroE y AroBS. Los colores de los segmentos indican la enzima de la cual proceden: AroE, rojo; AroBS, verde. El dominio Rossmann de cada enzima se representa en un color atenuado. La proteína objeto de este estudio (C. EBE) se encuadra con líneas punteadas.

EBE es entonces una quimera activa generada por la recombinación de dos enzimas homólogas con un 35% de identidad; sin embargo, falta conocer: ¿cuál es su eficiencia catalítica en comparación con sus proteínas parentales? ¿Existen cambios en el reconocimiento por el sustrato y/o el cofactor? ¿Cuál es su nivel de expresión en comparación con las proteínas parentales? El presente trabajo intenta abordar principalmente estas preguntas, con la finalidad de proveer mayor información acerca de los efectos de la recombinación de dominios.

4 HIPÓTESIS

La actividad enzimática de la quimera EBE es parecida a la de sus enzimas parentales.

5 OBJETIVOS

General

Determinar los parámetros cinéticos de la quimera EBE.

Particulares

1. Estandarizar las condiciones de expresión y purificación de las proteínas silvestres AroE y AroBS, y de la quimera EBE.
2. Medir y comparar la afinidad por sustrato y cofactor, las velocidades de reacción y la eficiencia catalítica de AroE, AroBS y EBE.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 CEPAS UTILIZADAS

Tabla 1. Cepas utilizadas.

Cepa	Genotipo
<i>E. coli</i> JM101	F' <i>traD36 proAB lacI</i> Δ(<i>lacZ</i>) M15/Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>glnV thi</i>
<i>E. coli</i> XL10-Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 tet ^R F'[<i>proAB lacI</i> ^q ΔM15 Tn10(Tet ^R Amy Cm ^R)]
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>
<i>E. coli</i> Rosetta RI, C41 & C43	F – <i>ompT hsdSB (rB- mB-)</i> <i>gal dcm</i> (DE3) F – <i>ompT hsdSB (rB- mB-)</i> <i>gal dcm</i> (DE3)

6.2 LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS DE PCR, SECUENCIACIÓN Y MUTAGÉNESIS

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia (5' – 3')
Clonación y Secuenciación	
pT4	GACATATAAACGGGTTCTGGCA
pT4.2	GCCAGTGAATTGTAATACGAC
BamHI_AroBS Fwd	ACAATCGGATCCATGAAAAAGCTGTACGGG
SmaI_AroBS.His Rev	AACTATCCCGGGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAGA
SmaI_AroBS Rev	AACTATCCCGGGAGATCCGTAACATTCTGTTC
Pspac_Fwd	CGGAAGGAAATGATGACCTCG
AroBS.His_Fwd	ATGAAAAAGCTGTACGGG
Mutagénesis Sitio Dirigida	
Fwd_AroEwt	GGACGCCTGCTGGGTGACAATACCGATGGTGTAG
Rev_AroEwt	CTTCCCATCGGTATGGTCACCCAGCAGGCGTCC
Fwd_EBEwt	GGACGCCTGCTGGGTGACAATACCGATGGGGAAG
Rev_EBEwt	CTTCCCATCGGTATTGTCACCCAGCAGGCGTCC

6.3 PLÁSMIDOS

Los vectores de expresión utilizados fueron: a) pT4, para expresión en *E. coli* JM101 y, b) pHCMC05, para expresión en *B. subtilis* 168. El plásmido pT4 presenta un *casete* de resistencia a kanamicina para la selección de clonas (25µg/mL) y un promotor fuerte *pTrc* de expresión constitutiva. El vector *shuttle* pHCMC05 fue donado por el Dr. Enrique Merino, tiene un promotor *Pspac* inducible por IPTG, un *casete* de resistencia a ampicilina (100 µg/mL) para su selección sólo en *E. coli* y uno de resistencia a cloranfenicol (5 µg/mL) para su selección tanto en *B. subtilis* como *E. coli* (Nguyen *et al.*, 2005).

6.4 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN

Las construcciones pT4-AroE.His, pT4-EBE.His y pT4-AroBS.His fueron generadas por la Dra. Claudia Martínez. Estas cuentan con la secuencia que codifica para una cola de 6 histidinas fusionada al final de la secuencia proteica para su purificación por cromatografía de afinidad a Níquel. El tamaño de los genes que codifican para AroE.His, EBE.His y AroBS.His es de 849 pb, 864 pb y 870 pb, respectivamente.

Para la construcción pHCMC05-AroBS.His se amplificó el inserto AroBS.His a partir del plásmido pT4-AroBS.His con los oligos BamHI_AroBS Fwd y SmaI_AroBS.His Rev. Se amplificó el gen de AroBS a partir de PCR de DNA genómico de *B. subtilis* 168 con los oligos BamHI_AroBS Fwd y SmaI_AroBS Rev para la construcción de pHCMC05-AroBS. Los nombres de los oligos indican los sitios de restricción insertados para digerir y clonar los productos de PCR.

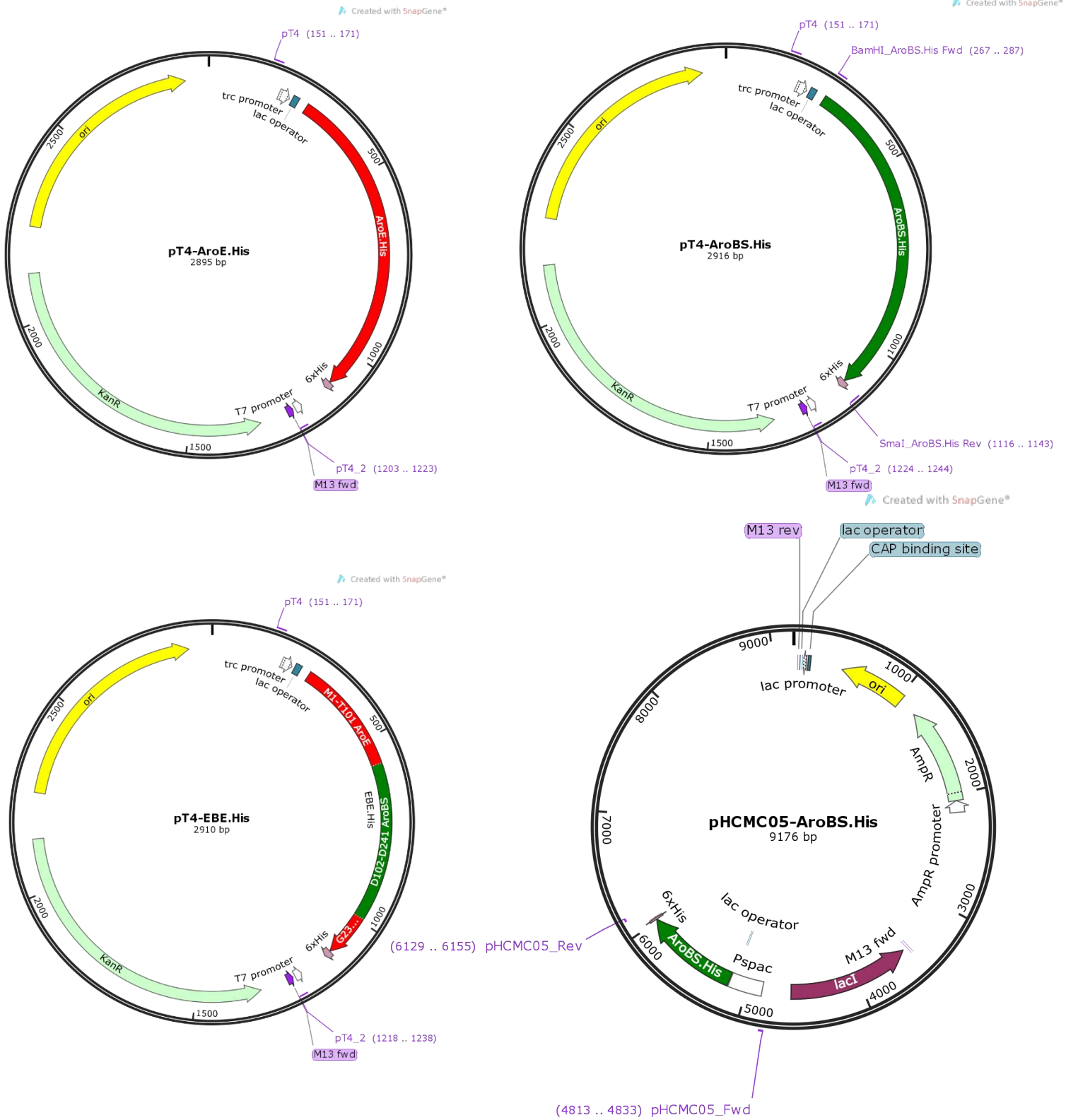


Figura 7. Mapas de vectores utilizados.

Amplificación por PCR

El inserto con histidinas AroBS.His y el gen de AroBS (Figura 8) fueron amplificados por PCR de la construcción pT4-AroBS.His y del DNA genómico de *B. subtilis* 168 (*Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific*), respectivamente. En ambos casos se utilizaron oligonucleótidos que insertaron sitios de restricción para BamHI (5'-terminal) y SmaI (3'-terminal). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ L cada una con agua tetradestilada, 1X *Buffer* Pfu Polimerasa (*Thermo Scientific*), 2.5 mM MgSO₄, 250 μ M dNTPS, 1.25U Pfu Polimerasa (*Thermo Scientific*) y 0.5 μ L de cada oligo a 10 pmol/ μ L.

Las muestras se incubaron a 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s (desnaturalización), 60°C por 30 s (alineamiento) y 72°C por 30 s (extensión), y al final de los ciclos se dejó un período de 5 min de extensión final a 72°C. Se corrieron 40 μ L de cada producto de PCR en gel TAE 1% agarosa y se purificaron con el *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

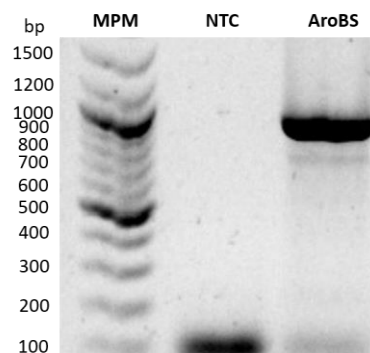


Figura 8. AroBS amplificado de DNA genómico de *B. subtilis* 168. MPM, marcador de peso molecular; NTC, *no template control*.

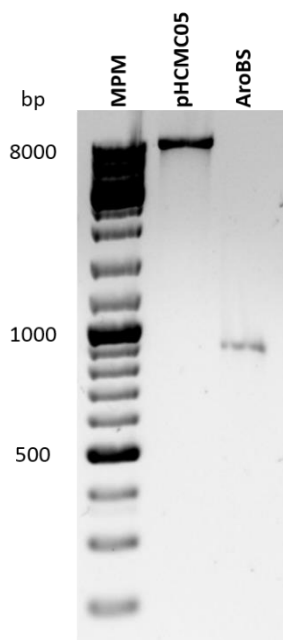


Figura 9. Plásmido pHCMC05 e inserto AroBS digeridos y purificados. MPM, marcador de peso molecular.

Digestión

Cada producto de PCR y el vector pHCMC05 fueron sometidos a doble digestión con las enzimas FastDigest (FD) BamHI y SmaI (*Thermo Scientific*) en reacciones con un volumen final de 50 μ L para los productos de PCR y 40 μ L para el vector pHCMC05. Las digestiones se llevaron a cabo con agua tetradestilada, 1X *FD Buffer* (*Thermo Scientific*), 2U de cada enzima, 2 μ g de DNA en la digestión de pHCMC05 y 0.5 μ g de DNA para los productos de PCR. Cada reacción se incubó a 37°C por 10 min, posteriormente se incubaron a 65°C por 10 min para inactivar las enzimas. Cada muestra se llevó a un volumen final de 100 μ L con agua tetradestilada y se purificó el DNA con el protocolo de *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) (Figura 9).

Ligación y transformación

Las ligaciones se llevaron a cabo en una relación molar 3:1 del inserto con el vector en un volumen final de 15 μL con agua tetradestilada, 1X T4 DNA Ligase Buffer y 5U de ligasa T4 (*Thermo Scientific*). Las reacciones se incubaron a 16°C por 16 horas y al final se inactivó la ligasa incubando las muestras a 70°C por 5 min. Se transformaron 2 μL de cada reacción en 100 μL de células quimiocompetentes *E. coli* XL10-Gold, las cuales se dejaron recuperar en 0.5mL de LB a 37°C en agitación por 4 horas, antes de platear en cajas de LB + amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

De las colonias que crecieron, se seleccionaron al azar 16 transformadas con pHCMC05-AroBS.His y 13 colonias transformadas con pHCMC05-AroBS para su análisis por PCR, los cuáles se hicieron en las condiciones previamente descritas. Una colonia positiva de cada construcción se creció O/N a 37°C en LB + amp (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para purificar plásmido con el *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). El plásmido pHCMC05-AroBS.His se secuenció con los oligos Pspac_Fwd y AroBS.His_Fwd en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del IBT UNAM para corroborar la construcción. La construcción pHCMC05-AroBS se comprobó por patrón de digestión en un gel TAE 1% agarosa, después de digerir 1 μg de plásmido con 1U de la enzima HindIII (*Thermo Scientific*) (Figura 10).

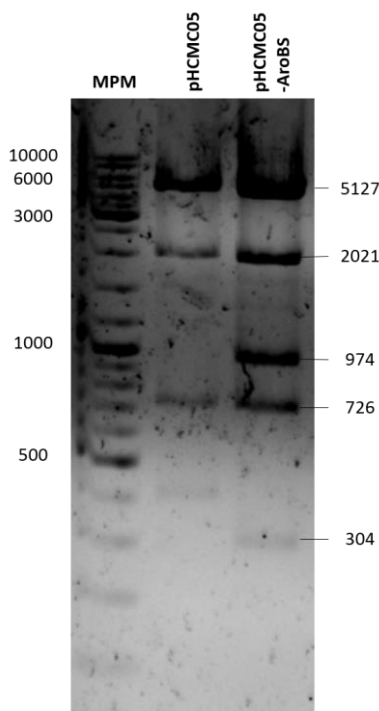


Figura 10. Digestión de pHCMC05-AroBS con HindIII para comprobar la clonación. MPM, marcador de peso molecular.

6.5 MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA

Los plásmidos pT4-AroE.His y pT4-EBE.His fueron mutados por PCR mutagénica sitio dirigida en el sitio H100 (resaltado en verde en la sección 6.6). AroE fue mutado por el M. C. Fernando García. La PCR mutagénica de EBE se realizó de acuerdo al protocolo de *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)* en un volumen final de reacción de 50 μ l con agua tetradestilada, 50 ng del plásmido pT4-EBE.His, 125 ng de los oligos Fwd_EBEwt y Rev_EBEwt, 1 μ L de dNTP mix y 2.5 U de PfuUltra HF DNA polimerasa (*Agilent Technologies*). Las muestras se incubaron a 95°C por 30 s, 12 ciclos a 95°C por 30 s (desnaturalización), a 55°C por 1 min (alineamiento) y a 68°C por 4 min (extensión).

Para eliminar el DNA que no contenía la mutación se agregó 1 μ L (10U/ μ L) de la enzima de restricción DpnI (*Agilent Technologies*) directamente a los productos de PCR y se incubaron a 37°C por 1 hora. Se transformó 1 μ L del producto de PCR digerido en 100 μ L de células quimiocompetentes *E. coli* XL10-Gold, se dejaron recuperar en 0.5 mL de LB a 30°C en agitación por 4 horas y se platearon en cajas de LB + Kan (25 μ g/mL). Una de las colonias que crecieron se incubó O/N a 37°C en 5 mL de LB + Kan (25 μ g/mL) y se purificó el plásmido con el *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). Se secuenció el gen EBE mutado usando los oligos pT4 y pT4.2.

6.6 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LAS ENZIMAS ESTUDIADAS

> AroE.His N100H

METYAVFGNPIAHSKSPFIHQFAQQLNIEHPYGRVLAPINDFINTLNAFFSAGGKGANVTVPFKEEAFARADEL
TERAALAGAVNTLMRLEDGRLLGDHTDGVGLLSDLERLSFIRPGLRILLIGAGGASRGVLLPLSLDCAVTITNRTV
SRAEELAKLFAHTGSIQALSMDLEGHEFDLIINATSSGISGDIPAIPSSLIHPGIYCYDMFYQKGKTPFLAWCEQRG
SKRNADGLGMLVAQAAHAFLLWHGVLPDVEPVIKQLQEELSAWPGSHHHHHH

> EBE.His N100H

METYAVFGNPIAHSKSPFIHQFAQQLNIEHPYGRVLAPINDFINTLNAFFSAGGKGANVTVPFKEEAFARADEL
TERAALAGAVNTLMRLEDGRLLGDHTDGEFVKSLMKVLDKPISELSFLMIGAGGAARAIFTTIVRNTPKKFDICN
RTLEKAKRLTEATPSFHNKEVLSIKEAEERLEQYDVIIHTTSVGMYPNVDDVPLSLQRAASSAVVCDIVYNPIQTAL
LKEASQKGLKTLDGLGMLVAQAAHAFLLWHGVLPDVEPVIKQLQEELSAWPGSHHHHHH

> AroBS.His

MKKLYGVIGNPVGHSMSPDIHNASLKDGLDGHYHAFKVEENDLEDAVKGIRALGVQGINVTVPHKVSIMDYL
DHIDESAKVLGAVNTVRREGDKLVGYNTDGEFVKSLMKVLDKPISELSFLMIGAGGAARAIFTTIVRNTPKKFDI
CNRTLEKAKRLTEATPSFHNKEVLSIKEAEERLEQYDVIIHTTSVGMYPNVDDVPLSLQRAASSAVVCDIVYNPIQT
ALLKEASQKGLKTLDGVMFVEQAALSFQLWTGQEPNIEKMRSIVIGKLGTECYGSHHHHHH

> AroE.His

METYAVFGNPIAHSKSPFIHQFAQQLNIEHPYGRVLAPINDFINTLNAFFSAGGKGANVTVPFKEEAFARADEL
TERAALAGAVNTLMRLEDGRLLGDNTDGVGLLSDLERLSFIRPGLRILLIGAGGASRGVLLPLSLDCAVTITNRTV
SRAEELAKLFAHTGSIQALSMDLEGHEFDLIINATSSGISGDIPAIPSSLIHPGIYCYDMFYQKGKTPFLAWCEQRG
SKRNADGLGMLVAQAAHAFLLWHGVLPDVEPVIKQLQEELSAWPGSHHHHHH

> EBE.His

METYAVFGNPIAHSKSPFIHQFAQQLNIEHPYGRVLAPINDFINTLNAFFSAGGKGANVTVPFKEEAFARADEL
TERAALAGAVNTLMRLEDGRLLGDNTDGEFVKSLMKVLDKPISELSFLMIGAGGAARAIFTTIVRNTPKKFDIC
NRTLEKAKRLTEATPSFHNKEVLSIKEAEERLEQYDVIIHTTSVGMYPNVDDVPLSLQRAASSAVVCDIVYNPIQTA
LLKEASQKGLKTLDGLGMLVAQAAHAFLLWHGVLPDVEPVIKQLQEELSAWPGSHHHHHH

6.7 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

6.7.1 Con el Vector pT4

Las construcciones en el vector pT4 fueron transformadas en cepas quimiocompetentes derivadas de *E. coli*: JM101, C41, C43 y RI para comprobar la expresión de las proteínas con *western blot* anti-His. Se inoculó una colonia de cada transformación en 100 mL de LB + Kan, se incubaron a 30°C en agitación (200rpm) hasta que alcanzaron 2 OD_{600nm}. Los cultivos se centrifugaron a 8,000 rpm, 4°C durante 10 min.

Las pastillas se resuspendieron en 10 mL de *buffer* de lisis y se sonicaron por 5 min con pulsos y pausas de 10 s. Las muestras lisadas se centrifugaron a 11,000 rpm, 4°C por 15 min, se desecharon las pastillas (fracción insoluble) de todas las muestras, excepto las correspondientes a los cultivos JM101, éstos se resuspendieron en 100 µL de *buffer* de carga y se corrieron 5 µL en geles SDS-PAGE al 15%; mientras que de la fracción soluble (extracto crudo) se cargaron 5 µg de proteína de cada muestra. La concentración de proteína fue cuantificada por el método de Bradford.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa pasando una corriente de (área del gel x 0.8) mA por 1.5 horas. Las membranas se bloquearon con TBST-leche 5% por 2 horas a temperatura ambiente u O/N a 4°C, se lavaron 3 veces por períodos de 10 min con TBST, se incubaron por 1 hora con el anticuerpo anti-6xHis (Thermo Fisher) en una relación 1:500. Se volvieron a lavar con TBST y al final se revelaron agregando 0.5 mL de Novex.

6.7.2 Con el Vector pHCMC05

Competentes y Transformación en *B. subtilis* 168

Para preparar las competentes de *B. subtilis* 168 se inoculó una asada grande de colonias de *B. subtilis* 168 (estriadas una noche antes en una placa de LB) en 1 mL de MM1 y se dejó incubando a 37°C, 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó 1.2 OD_{600nm} (3 horas aproximadamente). Se diluyeron 250 µL del cultivo en MM2 y se mezcló con vórtex. Se hicieron alícuotas de 500 µL en tubos Eppendorf, las cuáles se transformaron con 10 µL de plásmido (~200 ng/µL), después se dejaron incubando en agitación a 37°C por 2 horas y al final se platearon 150 µL de cada transformación en LB + Cam (25 µg/mL).

Soluciones requeridas:

Sales para *B. subtilis* 10X

K_2HPO_4

KH_2PO_4

$(NH_4)_2SO_4$

Na_2 Citrato

Aforar a 100mL

MM1

1X Sales para *B. subtilis*

0.5% Glucosa

5mM $MgSO_4$

0.02% Casaminoácidos

50 μ g/mL Triptófano

MM2

1X Sales para *B. subtilis*

0.5% Glucosa

5mM $MgSO_4$

0.01% Casaminoácidos

5 μ g/mL Triptófano

Inducción de la Expresión con IPTG

A partir de un pre-inóculo de 5 mL LB + Cam (25 μ g/mL) de las colonias transformadas, se hicieron cultivos de 50 mL LB + Cam (25 μ g/mL) iniciando en 0.5 OD_{600nm} a 37°C, 250 rpm. Cuando alcanzaron 1 OD_{600nm} se agregó IPTG a 0.5 o 1 mM de concentración final y se detuvo el crecimiento del cultivo después de 0.5, 1 y 1.5 horas de la inducción.

6.8 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Cultivos de 500 mL saturados de *E. coli* JM101 transformadas con AroE, y cultivos de 200 mL para el caso de EBE² (O/N 30°C, 200 rpm), se centrifugaron a 8,000 rpm, 4°C durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las pastillas con *buffer* de lisis en 10% del volumen inicial del cultivo. Se agregó PMSF en una concentración final de 0.1mM. Las muestras homogeneizadas con vórtex se sonicaron por 10 min, con pulsos de 10 s, pausas 10 s y amplitud de 70% y manteniendo cada muestra siempre en hielo.

Después se centrifugaron a 11,000rpm, 4°C por 15 min para recuperar la fracción soluble y purificar la proteína por cromatografía de afinidad en una columna de NTA-Níquel (*HisTrap, GE Healthcare*), previamente equilibrada con *buffer* de lisis. Para la proteína AroE se usó un *buffer* de lavado con 75 mM Imidazol y para EBE con 35 mM Imidazol. AroE se eluyó en fracciones de 5mL de *buffer* de elución 250 mM de Imidazol y EBE se colectó en fracciones de 7.5 mL de *buffers* de elución 75 y 250 mM Imidazol.

Se comprobó el estado de pureza de las proteínas en geles SDS-PAGE al 15% de acrilamida conteniendo 0.5% del reactivo fluorescente 2,2,2-tricloroetanol y se juntaron las fracciones con proteína pura. Los geles fueron visualizados en un fotodocumentador *Gel Doc EZ System* (BioRad) con una pantalla para fluorescencia *Stan Free Sample Tray* (BioRad). Las proteínas se concentraron y dializaron con filtros Amicon (*Healthcare*) de 10 kDa de corte con *buffer* de fosfato de sodio 50 mM y pH 8.0, hasta alcanzar un factor de dilución mayor o igual a 1:10,000³.

6.9 ENSAYOS IN VITRO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática de las enzimas se determinó midiendo la producción de NADPH ($\epsilon = 6.18 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 340 nm en un espectrofotómetro (Belkman). Las reacciones se llevaron a cabo en *buffer* Tris-HCl 100 mM en un volumen final de reacción de 100 μL , agregando la cantidad de enzima que permitiera observar la fase lineal de la reacción. Los valores cinéticos de las enzimas se determinaron variando ya sea el sustrato o el cofactor, mientras se mantenía al otro a una concentración fija y saturante, 4 mM para shikimato y 1 mM para NADP⁺.

² Los cultivos de JM101 transformada con pT4-EBE.His se hacían en volúmenes no mayores a 200 mL (matraces de 1L) porque en volúmenes de 500 mL no se obtenía expresión de la proteína.

³ La proteína EBE no se guardaba O/N a concentraciones mayores a 5 mg/mL porque se precipitaba fácilmente en esas condiciones

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión de las Proteínas Recombinantes

A partir de cultivos de 50 mL de células de *E. coli* JM101 transformadas con pT4-AroE.His, pT4-AroBS.His o pT4-EBE.His se obtuvieron extractos proteicos totales para observar por *western blot* si las SDH recombinantes se expresaban con el promotor constitutivo del vector y en la cepa JM101.

Los insertos tienen una secuencia que codifica para una cola de 6 Histidinas en el extremo C-terminal de las proteínas, por lo que se hizo *western blot* con un anticuerpo específico a la etiqueta de 6xHis (anti-6xHis) para comprobar que las proteínas se estuvieran expresando. El peso molecular teórico calculado por la herramienta *Compute pI/Mw* de *ExPASy* para AroE.His, AroBS.His y EBE.His fue de 30.68, 31.72 y 31.56 kDa, respectivamente.

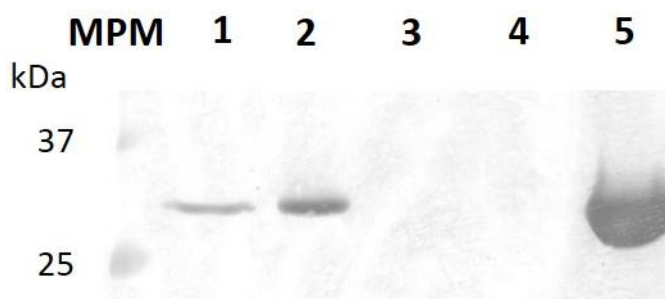


Figura 11. Expresión de las proteínas EBE, AroBS y AroE. Western blot anti-6xHis, de izquierda a derecha: MPM, marcador de peso molecular; carril 1, EBE soluble; carril 2, EBE insoluble; carril 3, AroBS soluble; carril 4, AroBS insoluble; carril 5, AroE soluble. Para las fracciones solubles se cargaron 50 μ g de extracto proteico en el gel de electroforesis y para las fracciones insolubles se resuspendieron los pellets correspondientes a 5 mL de cultivo en 0.5 mL de buffer de Carga de Proteínas 4X y se cargaron 20 μ L.

De acuerdo a lo observado en el gel, AroE fue la deshidrogenasa que tuvo una mayor expresión (Figura 11, carril 5). La quimera EBE se expresó en muy bajas cantidades (Figura 11, carriles 1 y 2), al parecer la mayor parte de ella es insoluble y podría estar yéndose a cuerpos de inclusión (Figura 11, carril 2). No hubo ninguna señal que indicara que se está expresando la deshidrogenasa de *B. subtilis* (AroBS) en la cepa JM101 de *E. coli* (Figura 11, carriles 3 y 4).

El hecho de que no se detectara expresión de AroBS llevó a pensar que la cepa JM101 pudiera tener problemas para sintetizar la enzima. Por lo que se probó si se detectaba alguna señal de AroBS con la etiqueta 6xHis utilizando algunas cepas optimizadas para la expresión heteróloga de proteínas, como lo son las de la línea Rosetta. Sin embargo, los resultados fueron similares (Figura 12).

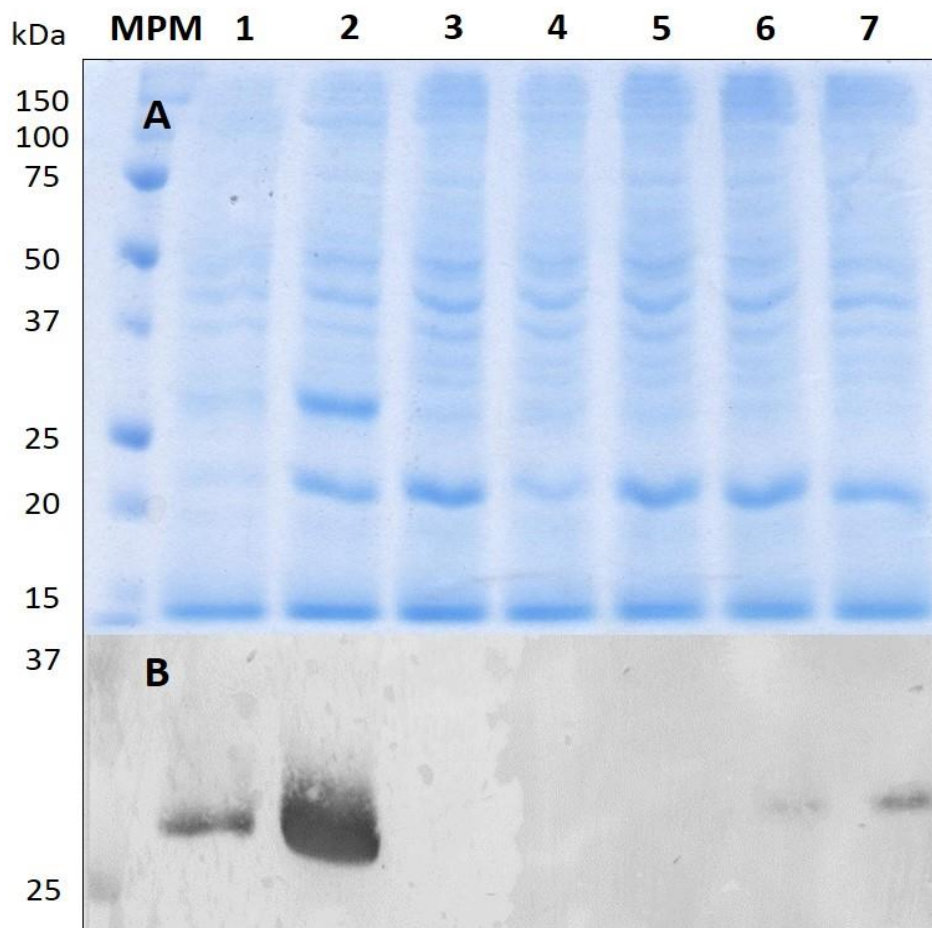


Figura 12. Ensayos de expresión en cepas Rosetta C41, C43 y RI. (A) Tinción con azul de Coomassie de extractos proteicos. (B) Western blot anti-6xHis de extractos proteicos. MPM, marcador de peso molecular; carril 1, C43 AroE.His; carril 2, RI AroE.His; carril 3, C41 AroBS.His; carril 4, C43 AroBS.His; carril 5, RI AroBS.His; carril 6, C43 EBE.His; carril 7, RI EBE.His.

Al no poder expresar heterológicamente a AroBS en cepas de *E. coli* se optó por intentarlo en la cepa que expresa la proteína de manera silvestre, *B. subtilis* 168. Para ello se amplificó por PCR el inserto de AroBS con su etiqueta 6xHis del plásmido pT4 y se clonó en pHCMC05, un vector *shuttle* de expresión en *B. subtilis* inducible por IPTG.

Se transformó *B. subtilis* 168 con la nueva construcción pHCMC05-AroBS.His y se seleccionaron las colonias transformantes con cloranfenicol (25 µg/mL). Se plateó *B. subtilis* 168 sin transformar en un gradiente de 0, 5, 10, 15 y 25 µg/mL de cloranfenicol como control de transformación. No hubo crecimiento de *B. subtilis* desde la concentración de antibiótico más baja utilizada (5 µg/mL), por lo que las colonias transformantes que crecieron en presencia del antibiótico debían contener la construcción. También se comprobó la transformación de pHCMC05-AroBS.His amplificando el gen AroBS.His por PCR de colonia (Figura 13).

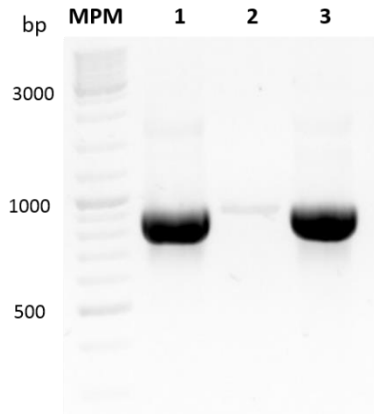


Figura 13. PCR de colonia de AroBS.His en *B. subtilis* 168 transformadas con la construcción pHCMC05-AroBS.His. MPM, marcador de peso molecular; carril 1, AroBS.His amplificados de pT4-AroBS.His; carril 2, NTC (*no template control*); carril 3, AroBS.His amplificado de colonia de *B. subtilis* 168 transformada con pHCMC05-AroBS.His.

Se hizo un pre-inóculo en 5 mL LB + Cam (25 µg/mL) de la colonia positiva probada por PCR. A partir del pre-inóculo, se crecieron cultivos de 50 mL con 0.5 DO_{600nm}. Cuando los cultivos alcanzaron OD_{600nm} de 1.0 se indujo la expresión del gen contenido en el inserto con dos concentraciones distintas de IPTG y se colectaron muestras de cultivos a tres distintos tiempos de exposición (30, 60 y 90 minutos) con el inductor. Se analizó por *western blot* nuevamente para ver si se había logrado la expresión; sin embargo los resultados fueron similares: no hubo expresión de AroBS en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 14). Al comparar la secuencia del gen *aroBS*.His clonado con la reportada en el *NCBI* para la cepa *B. subtilis* 168, se detectó que había una mutación en la secuencia que se traducía en el cambio de una isoleucina por una valina en la posición 12.

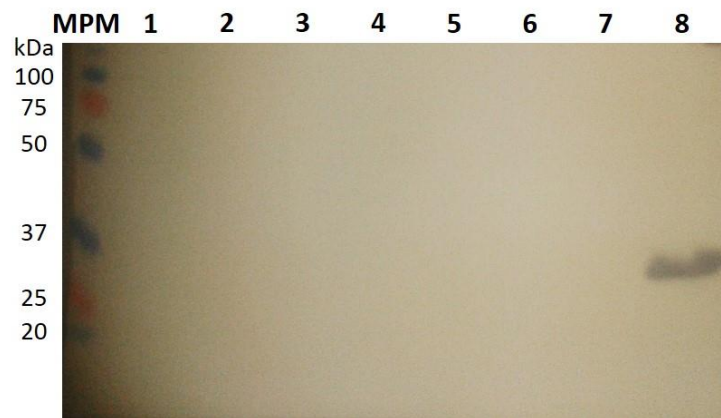


Figura 14. Ensayos de expresión de AroBS.His con el vector pHCMC05 en *B. subtilis* 168. MPM, marcador de peso molecular; carril 1 – carril 4, 0.5 mM IPTG t₀, t₆₀, t₁₂₀, t₁₆₀ (respectivamente); carril 5 – carril 7, 1 mM IPTG t₆₀, t₁₂₀, t₁₆₀ (respectivamente); carril 8, control EBE.His pura. El tiempo se reporta en minutos después de la inducción con IPTG.

Para comprobar si la sustitución mencionada, o la etiqueta 6xHis, eran las responsables de que AroBS no pudiera expresarse homológamente en *B. subtilis* 168, se amplificó el gen *aroBS* (*aroE_{BS}*) a partir de una PCR de colonia. El producto fue clonado también en pHCMC05, la construcción se transformó y se repitieron los ensayos de expresión con IPTG en *B. subtilis* 168. Se tiene reportado que la expresión inducida con el vector utilizado se incrementa para la proteína HtpG en *B. subtilis* (Nguyen *et al.*, 2005); por lo tanto, los resultados fueron analizados por intensidad de bandas en un gel de electroforesis, pero no se observó enriquecimiento de la expresión en ninguna condición (Figura 15).

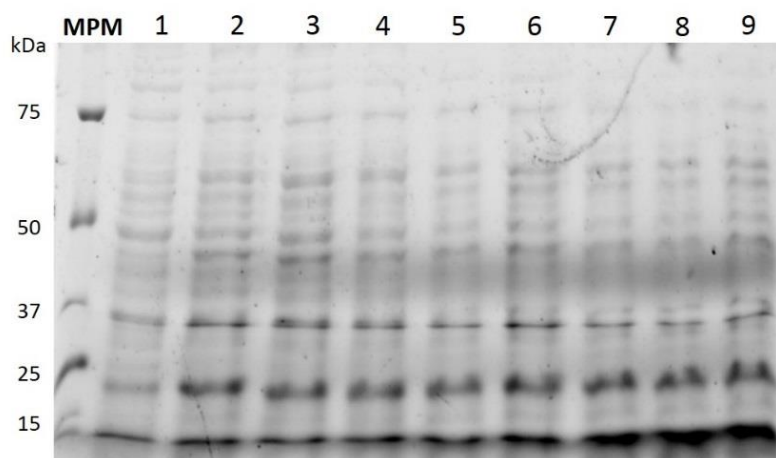


Figura 15. Ensayos de expresión de AroBS (s/6xHis) con pHCMC05 en *B. subtilis* 168. MPM, marcador de peso molecular; carril 1, *B. subtilis* 168 sin transformar; carril 2, AroBS sin inducir; carril 3, 0.5 mM IPTG t₃₀; carril 4, 1 mM IPTG t₃₀; carril 5, 0.5 mM IPTG t₆₀; carril 6, 1 mM IPTG t₆₀; carril 7, AroBS sin inducir; carril 8, 0.5 mM IPTG t₉₀; carril 9, 1 mM IPTG t₉₀. El tiempo se reporta en minutos después de la inducción IPTG.

Existen distintas razones por las cuáles una proteína recombinante podría no expresarse, la toxicidad de la proteína es una de ellas. Esta podría ocurrir cuando la proteína realiza una función innecesaria o perjudicial en la célula huésped (Rosano & Ceccarelli, 2014). A pesar de que AroBS es una proteína homóloga de AroE y de que los cultivos de *E. coli* JM101 transformada con pT4-AroBS.His siempre se saturaron, no se descartó que fuera tóxica para la cepa JM101.

El control de la expresión basal de una proteína bajo la regulación de un promotor inducible se ha descrito como una posible solución para la expresión de proteínas tóxicas (Rosano & Ceccarelli, 2014). Por ello se intentó expresar a AroBS en *B. subtilis* 168 bajo la regulación de un promotor inducible. Sin embargo, tampoco funcionó. Lo cual fue contrario a lo esperado, ya que esta proteína es sintetizada por *B. subtilis* 168, aunque podría ser tóxica en altas cantidades y por ese motivo la cepa contrarrestar su expresión en altas cantidades. Ante esa situación una posible solución sería agregar a la proteína recombinante una etiqueta peptídica que induzca su secreción al periplasma o el medio de cultivo (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Otra posible razón por la cual no se detectó la expresión homóloga de AroBS en *B. subtilis* 168 con el vector pHCMC05 es que los niveles de inducción del promotor Pspac son muy bajos y por lo tanto es muy difícil detectar cambios en la intensidad de bandas en una electroforesis de extracto crudo. La alternativa sería utilizar un vector con un promotor constitutivo (Nguyen *et al.*, 2005).

Purificación de AroE y EBE

La purificación de las proteínas AroE y EBE se llevó a cabo aprovechando la presencia de la etiqueta 6xHis localizada en el C-terminal de cada proteína. Las histidinas interaccionan con el Ni; por lo tanto, al pasar muestras de extracto proteico total por una columna con matriz de agarosa y Ni (HisTrap) las proteínas que presenten la etiqueta 6xHis se quedarán unidas por afinidad a la matriz.

Para reducir la interacción de otras proteínas que pudieran tener baja afinidad al Ni, el *buffer* de lisis en el que se recuperan las proteínas tiene una concentración baja de imidazol (10 mM). El imidazol presenta también una alta afinidad por el Ni, así que compite con las proteínas que pudieran interaccionar con la matriz de la columna (incluyendo las recombinantes con la etiqueta de histidinas). La columna fue lavada con exceso (10 – 15 volúmenes) de *buffer* de lavado con un gradiente de imidazol (35 mM – 250 mM), hasta encontrar el gradiente que permitiera recuperar la mayor cantidad de AroE y EBE en el mayor grado de pureza posible (Figura 16A y 16D).

Cabe mencionar que en los primeros intentos de purificación de EBE no se obtenía proteína en ninguna de las fracciones (Figura 16B), lo cual fue confirmado por *western blot* (Figura 16C). La única diferencia que existía entre el protocolo empleado para comprobar la expresión de EBE (Figura 11) y el de purificación era el volumen del cultivo (50 y 500 mL, respectivamente); por lo tanto, se probó si haciendo cultivos independientes en volúmenes pequeños de 50 a 200 mL de LB se observaba la expresión.

Al reducir el volumen de cultivo se volvió a observar expresión de EBE, nuevamente en muy baja proporción respecto a las proteínas endógenas. Pero a través de la incubación y expresión en varios cultivos independientes, se lograron obtener cantidades suficientes de EBE para purificarla y recuperar una concentración suficiente para llevar a cabo los ensayos de actividad, pese a la pérdida que ocurre durante los lavados (Figura 16D).

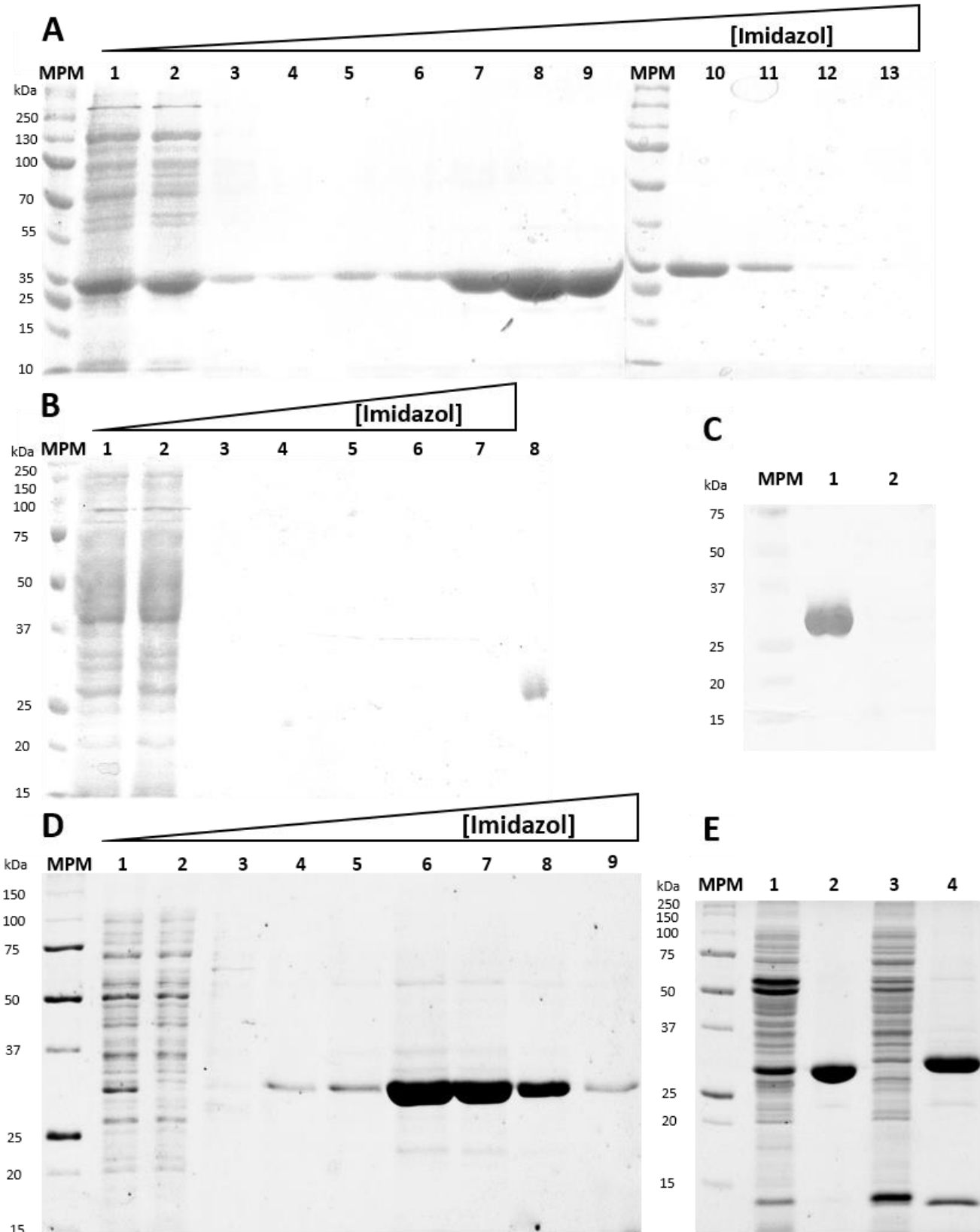


Figura 16. Purificación de AroE.His y EBE.His. (A) Purificación AroE.His. Carril 1, extracto crudo; carril 2-7, lavados con 75 mM imidazol; carril 8-13, elución AroE.His con 250 mM imidazol. (B) Ensayo de purificación EBE.His. Carril 1, extracto crudo (a partir de 500 mL de cultivo); carril 2-7, lavados con 75, 100, 200 y 300 mM imidazol; carril 8, AroE.His pura. (C) Western blot anti-6xHis. Carril 1, AroE.His pura; Carril 2, extracto crudo EBE.His (a partir de 500 mL de cultivo). (D) Purificación de EBE.His. Carril 1, extracto crudo; carril 2, extracto crudo después de pasarlo por columna HisTrap; carril 3-5, lavados con 35 mM imidazol (50 mL buffer de lavado c/u); carriles 6-7, elución EBE.His con 75 mM imidazol; carril 8-9, elución EBE.His con 250 mM imidazol (5 mL de buffer de elución recolectados en muestras de carriles 6-8 y 15 mL para carril 9). (E) Enzimas puras para ensayos de actividad enzimática. Carril 1, extracto crudo AroE.His; carril 2, AroE. His pura; carril 3, extracto crudo EBE.His; carril 4, EBE.His pura. Abreviaturas: MPM, marcador de peso molecular.

Actividad Enzimática *In Vitro*

Los parámetros cinéticos aparentes obtenidos para cada enzima se presentan en la Tabla 3. Las gráficas se ajustaron a una ecuación hiperbólica (Figura 17), indicando que las reacciones químicas catalizadas por las enzimas obedecen una cinética Michaelis-Menten para el sustrato shikimato y el cofactor NADP⁺. Los valores de K_m y k_{cat} de shikimato que fueron calculados primero para AroE son 710.4 μM y 13.06 s^{-1} , respectivamente. Para NADP⁺ la K_m fue de 89.42 μM y k_{cat} 9.9 s^{-1} .

Estos valores se encuentran muy por debajo de los reportados para AroE de *E. coli* en Michel *et al.* (2003), los cuales son k_{cat} 237 s^{-1} y K_m de shikimato y NADP⁺ de 65 y 56 μM , respectivamente. Como consecuencia la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de AroE estaba dos órdenes de magnitud por debajo de lo reportado, $1.83 - 11 \times 10^4$ es el rango de las calculadas y $3.65 - 4.23 \times 10^6$ el de las reportadas (Tabla 3).

Espinosa (2010) mutó una adenina por una citosina en la posición 298 de la secuencia de AroE para generar el sitio de recombinación de las quimeras. Esto provocó el cambio de Asn¹⁰⁰ por His¹⁰⁰ (N100H) en la cadena polipeptídica. La baja eficiencia catalítica calculada para AroE llevó a pensar que dicha mutación estaba comprometiendo su actividad catalítica (Figura 18), para comprobarlo se revirtió dicha mutación.

Tabla 3. Parámetros cinéticos aparentes de la enzima parental AroE y la quimera EBE. ⁴

Enzimas	Shikimato (NADP ⁺)				NADP ⁺ (Shikimato)			
	V_{max} (U mg ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	V_{max} (U mg ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
AroE _{N100H}	25.54 ± 0.91	710.4 ± 85.94	13.06	1.83 × 10 ⁴	19.38 ± 1.17	89.42 ± 19.11	9.9	1.1 × 10 ⁵
EBE _{N100H}	6.11 ± 0.29	584.2 ± 80.06	3.22	5.51 × 10 ³	4.79 ± 0.19	53.85 ± 8.72	2.52	4.68 × 10 ⁴
AroE	519.3 ± 16.74	264.1 ± 35.83	265.75	1.01 × 10 ⁶	540.6 ± 20.58	179.2 ± 20.58	276.7	1.54 × 10 ⁶
EBE	73.07 ± 2.5	358.3 ± 48.53	38.56	1.08 × 10 ⁵	74.60 ± 3.38	100.9 ± 15.61	39.35	3.9 × 10 ⁵
AroE (Michel <i>et al.</i> , 2003)	-	65	237	3.65 × 10 ⁶	-	56	237	4.23 × 10 ⁶

⁴ Todas las constantes fueron calculadas en *buffer* Tris-HCl 100 mM (pH 9.0) a 25°C. Los valores fueron determinados modificando ya sea la concentración de sustrato o cofactor, mientras se mantenía al otro (mostrado en paréntesis) en una concentración fija saturante.

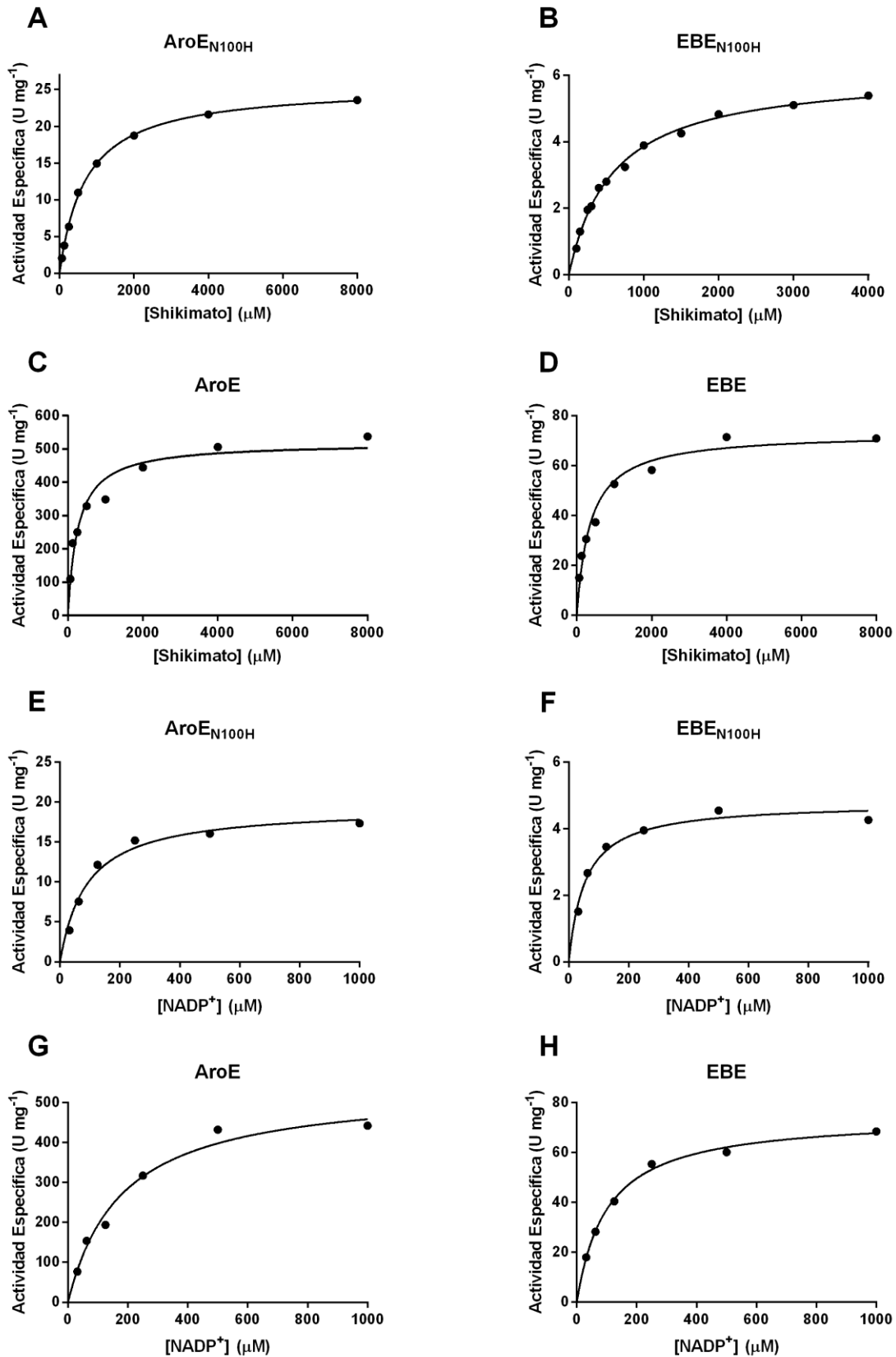


Figura 17. Cinéticas de actividad específica de las enzimas AroE y EBE ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten. Actividades específicas medidas en concentraciones variables de sustrato (Shikimato) o cofactor (NADP⁺) mientras la concentración del otro se mantenía en un nivel de saturación constante. La actividad enzimática se midió catalizando la reacción inversa de SDH a 25°C en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 9.0. La reacción catalizada por AroE y EBE fue monitoreada en su fase inicial por la absorbancia a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.18 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). (A) – (D) Shikimato como sustrato variable (62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 μM en A, C y D; 100, 150, 250, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000 y 4000 μM en B) mientras el NADP⁺ se mantenía en concentración saturante (1000 μM). (E) – (H) NADP⁺ como sustrato variable (31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 μM) mientras el Shikimato se mantenía en concentración saturante (4000 μM). Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima catalizando la conversión de 1 μmol de NADP⁺ por minuto a 25°C.

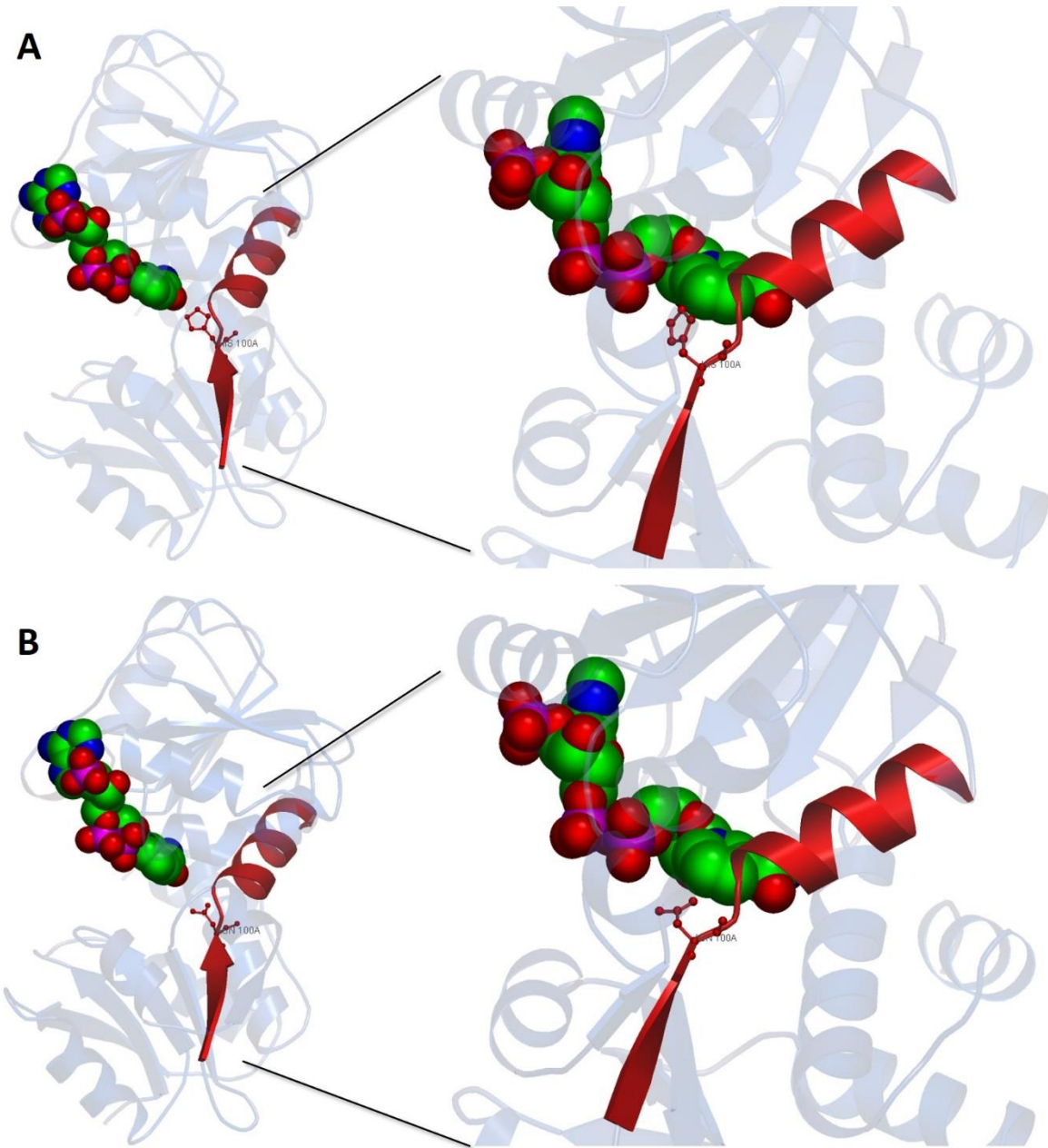


Figura 18. Posición e importancia del residuo 100 en la estructura de AroE. (A) Posición teórica del residuo His¹⁰⁰ en AroE con mutación N100H. (B) Posición del residuo Asn¹⁰⁰ en AroE con mutación revertida. Asn¹⁰⁰ se encuentra en los límites del dominio N-terminal y el conector con el dominio Rossmann, entre la hoja $\beta 6$ y la hélice $\alpha 5$. Este residuo se encuentra altamente conservado en la familia SDH y también se encuentra inmediato a los residuos 100% conservados Thr¹⁰¹ y Asp¹⁰². Asn¹⁰⁰ y Asp¹⁰² se encuentran expuestos hacia el sitio de unión a sustrato (Ye *et al.*, 2003) por lo que podrían estar participando directamente en ello. Thr¹⁰¹ participa en la formación de una red de puentes de hidrógeno en el conector entre el dominio N-terminal y el dominio Rossmann. Dicha red es importante en la función de bisagra de esta región, la cual permite el cambio de conformación abierta a cerrada una vez que se ha unido el sustrato y con ello la formación de un sitio activo productivo (Michel *et al.*, 2003). Se muestra en rojo la hoja $\beta 6$, hélice $\alpha 5$ y los residuos que las conectan. En esferas se representa al cofactor NADPH. Modelos creados en SWISS-MODEL.

Al revertir el cambio en la secuencia de la proteína por mutagénesis sitio dirigida, AroE recuperó niveles de actividad enzimática similares a los reportados (Michel *et al.*, 2003) con una k_{cat} de 265.75 s^{-1} (shikimato) y 276.7 s^{-1} (NADP⁺); *i.e.*, 25 veces mayor que la calculada al inicio. Además, al revertir el cambio también en la quimera EBE, se aumentó más de 10 veces su actividad enzimática. Con EBE_{N100H}, las V_{max} calculadas para shikimato y NADP⁺ fueron de 6.11 y 4.79 U mg^{-1} , respectivamente, una vez revertida la mutación EBE alcanzó una V_{max} de alrededor de 74 U mg^{-1} .

Michel *et al.* (2003) proponen que el residuo Asn¹⁰⁰ favorece el cambio conformacional que promueve la formación de un sitio activo productivo en AroE. Al revertir la mutación N100H en AroE y EBE, la K_m por shikimato de AroE se redujo 2.7 veces de 710.4 a 264.1 μM ; mientras que la de EBE se redujo 1.6 veces al ir de 584.2 a 358.3 μM . Sin embargo, sus K_m por NADP⁺ se incrementaron 2 veces: de 89.42 a 179.2 μM en AroE y de 53.85 a 100.9 μM en EBE. Los cambios de K_m por shikimato que tuvieron AroE y EBE al revertir la mutación N100H parecen evidenciar la participación de Asn¹⁰⁰ en la unión de la enzima al sustrato (Ye *et al.*, 2003).

Los valores calculados de eficiencia catalítica k_{cat}/K_m se acercaron mucho más a los reportados para AroE de *E. coli* (Michel *et al.*, 2003) una vez realizada la reversión de la mutación. AroE_{N100H} presentaba valores de k_{cat}/K_m de 1.83×10^4 y $1.1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ al calcularlos respecto a la variación de shikimato y NADP⁺, respectivamente. Una vez revertida la mutación estos aumentaron a 1.01×10^6 y $1.54 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, situándose en el mismo orden de magnitud que el reportado.

Las k_{cat}/K_m inicialmente calculadas en el caso de EBE_{N100H} fueron de 5.51×10^3 y $4.68 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ modificando las concentraciones de shikimato y NADP⁺, respectivamente. Una vez realizada la mutación sitio dirigida, estas eficiencias se incrementaron a $1.08 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ para shikimato y $3.9 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ para NADP⁺ en EBE.

Los valores de eficiencia catalítica de EBE superan a varios de los calculados *in vitro* para SDH recombinantes de distintos microorganismos (Peek & Christendat, 2015). Por ejemplo: *H. pylori* SDH presenta una k_{cat}/K_m para shikimato de $5.2 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ y para NADP⁺ de $3.9 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ (Han *et al.*, 2006). EBE tiene también una mejor k_{cat}/K_m aparente para NADP⁺ que *M. tuberculosis* SDH ($2.68 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$) (Fonseca *et al.*, 2006) y *S. epidermis* SDH ($2.28 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$) (Han *et al.*, 2009).

8 CONCLUSIONES

Adriana Espinosa (2010) construyó una enzima quimérica activa compuesta por dos dominios que contienen las regiones de unión a sustrato y a cofactor de dos aminoácidos deshidrogenasas homólogas. En este trabajo de tesis he realizado la caracterización enzimática de la quimera activa EBE, esto implica que la fusión de dominios realizada en el laboratorio del Dr. Segovia generó una enzima funcional, lo cual es uno de los criterios más sensibles para juzgar el plegamiento correcto de las enzimas diseñadas por ingeniería de proteínas (Kataoka *et al.*, 1994).

La quimera EBE y la proteína parental AroE pudieron expresarse heterológamente en la cepa JM101 de *E. coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad a níquel, a través de una etiqueta de histidinas anclada al final de sus secuencias. Sin embargo, la proteína parental AroBS no logró expresarse ni en la cepa JM101 de *E. coli*, ni en la cepa *B. subtilis* 168; por lo tanto, no se pudo comparar la actividad enzimática de la quimera EBE con AroBS.

Las proteínas EBE y AroE con las que se iniciaron los ensayos de actividad enzimática presentaban una histidina en la posición 100 de su estructura primaria, lo cual representa la sustitución de un residuo de asparagina del dominio N-terminal de acuerdo a la secuencia reportada para AroE (Michel *et al.*, 2003) (para diferenciarlas se denominaron AroE_{N100H} y EBE_{N100H}). Dicha sustitución se tradujo en valores de actividad enzimática 20 veces más bajos respecto a los reportados (Michel *et al.*, 2003).

La importancia del residuo N100 en el reconocimiento del sustrato y la actividad de shikimato deshidrogenasa se comprobó al revertir la mutación. Las enzimas AroE y EBE con la mutación revertida por mutagénesis sitio dirigida tuvieron valores de K_m aparentes por shikimato menores a los calculados para AroE_{N100H} y EBE_{N100H}, respectivamente. Tuvieron también una mayor actividad enzimática respecto a las últimas.

Al comparar los valores cinéticos de la quimera EBE con los calculados para la enzima parental AroE: EBE tuvo una mejor eficiencia catalítica y mayor afinidad por el cofactor NADP⁺, pero una menor afinidad por shikimato. Por lo tanto, la quimera EBE generada nos da evidencia de que el dominio Rossmann puede ser combinado entre proteínas con dominios homólogos para generar enzimas totalmente funcionales.

9 PERSPECTIVAS

No se pudo expresar la proteína AroBS en un sistema heterólogo con un promotor constitutivo, ni se pudo observar una sobreexpresión en un sistema homólogo con un promotor inducible. Las alternativas a probar para lograr sobreexpresarla son: a) agregar un péptido líder a la proteína AroBS que induzca su secreción al periplasma o medio de cultivo, y b) utilizar un vector shuttle para expresión en *B. subtilis* con un promotor constitutivo.

Dado que se ha observado que el intercambio de dominios homólogos puede generar que las quimeras producidas tengan afinidad por nuevos sustratos o cofactores, valdría la pena observar si la quimera EBE puede utilizar NAD^+ para llevar a cabo su función, lo cual no puede realizar AroE. Esto es importante porque para una posible aplicación a nivel industrial es menos costoso utilizar NAD^+ que utilizar NADP^+ .

Al haber comprobado que la modificación N100H en AroE y EBE afectó sus actividades enzimáticas valdría la pena revertir dicha mutación en las otras tres quimeras (EB, BE y BEB) generadas por Adriana Espinosa (2010) para observar si de alguna manera se mejora su expresión y plegamiento.

Con el objetivo de obtener mayor información sobre la cooperatividad del plegamiento Rossmann con otros dominios para llevar a cabo una función enzimática y su relevancia en la evolución de deshidrogenasas sería interesante cristalizar y obtener la estructura tridimensional de la quimera EBE.

10 BIBLIOGRAFÍA

Abrahamson MJ, Vazquez-Figueroa E, Woodall NB, Moore JC, Bommarius AS. 2012. Development of an amine dehydrogenase for synthesis of chiral amines. *Angew Chem* **51**: 3969 – 72.

Abrahamson MJ, Wong JW, Bommarius AS. 2013. The evolution of an amine dehydrogenase biocatalyst for the asymmetric production of chiral amines. *Adv Synth Catal* **355**: 1780 – 86.

Adachi O, Ano Y, Toyama H, Matsushita K. 2006a. Enzymatic preparation of metabolic intermediates, 3-dehydroquinate and 3-dehydroshikimate, in the shikimate pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 3081–3.

Adachi O, Ano Y, Toyama H, Matsushita K. 2006b. High shikimate production from quinate with two enzymatic systems of acetic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 2579–82.

Anton IA, Coggins JR. 1988. Sequencing and overexpression of the *Escherichia coli* *aroE* gene encoding shikimate dehydrogenase. *Biochem J* **249**: 319–26.

Bashton M, Chothia C. 2007. The generation of new protein functions by the combination of domains. *Structure* **15**: 85–99.

Bommarius BR, Schürmann M, Bommarius AS. 2014. A novel chimeric amine dehydrogenase shows altered substrate specificity compared to its parent enzymes. *Chem Commun (Camb)* **50**: 14953–5.

Bottoms CA, Smith PE, Tanner JJ. 2002. A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. *Protein Science* **11**: 2125–37.

Brenner SE, Chothia C, Hubbard TJ, Murzin AG. 1996. Understanding protein structure: using scop for fold interpretation. *Meth Enzymol* **266**: 635–43.

Cotton Rg, Gibson F. 1965. The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine; enzymes converting chorismic acid into prephenic acid and their relationships to prephenate dehydratase and prephenate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **100**: 76–88.

Espinosa Cantú, A. 2010. *Obtención de una quimera activa por la recombinación de dos shikimate deshidrogenasas*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Fonseca IO, Magalhães ML, Oliveira JS, Silva RG, Mendes MA, Palma MS, Santos DS, Basso LA. 2006. Functional shikimate dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: purification and characterization. *Protein Expr Purif* **46**: 429–37.

Han C, Hu T, Wu D, Qu S, Zhou J, Ding J, Shen X, Qu D, Jiang H. 2009. X-ray crystallographic and enzymatic analyses of shikimate dehydrogenase from *Staphylococcus epidermidis*. *FEBS J* **276**: 1125–39.

Han C, Wang L, Yu K, Chen L, Hu L, Chen K, Jiang H, Shen X. 2006. Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. *FEBS J* **273**: 4682–92.

Han J-HH, Batey S, Nickson AA, Teichmann SA, Clarke J. 2007. The folding and evolution of multidomain proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 319–30.

Herrmann KM, Weaver LM. 1999. The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 473–503.

Höcker B, Claren J, Sterner R. 2004. Mimicking enzyme evolution by generating new ($\beta\alpha$)₈-barrels from ($\beta\alpha$)₄-half-barrels. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 16448–16453.

Jacob F. 1977. Evolution and tinkering. *Science* **196**: 1161–1166.

Janin J, Wodak SJ. 1983. Structural domains in proteins and their role in the dynamics of protein function. *Prog Biophys Mol Biol* **42**: 21–78.

Kallberg Y, Oppermann U, Jörnvall H, Persson B. 2002. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur J Biochem* **269**: 4409–17.

Kallberg Y, Persson B. 2006. Prediction of coenzyme specificity in dehydrogenases/reductases. A hidden Markov model-based method and its application on complete genomes. *FEBS J* **273**: 1177–84.

Kataoka K, Takada H, Tanizawa K, Yoshimura T, Esaki N, Ohshima T, Soda K. 1994. Construction and characterization of chimeric enzyme consisting of an amino-terminal domain of phenylalanine dehydrogenase and a carboxy-terminal domain of leucine dehydrogenase. *J Biochem* **116**: 931–6.

Liu D-FF, Ai G-MM, Zheng Q-XX, Liu C, Jiang C-YY, Liu L-XX, Zhang B, Liu Y-MM, Yang C, Liu S-JJ. 2014a. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains. *Microb Cell Fact* **13**: 40.

Liu X, Lin J, Hu H, Zhou B, Zhu B. 2014b. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance shikimic acid production from sorbitol. *World J Microbiol Biotechnol* **30**: 2543–50.

Michel G, Roszak AW, Sauvé V, Maclean J, Matte A, Coggins JR, Cygler M, Laphorn AJ. 2003. Structures of shikimate dehydrogenase AroE and its Paralog YdiB. A common structural framework for different activities. *J Biol Chem* **278**: 19463–72.

Nguyen HD, Nguyen QA, Ferreira RC, Ferreira LCS, Tran LT, Schumann W. 2005. Construction of plasmid-based expression vectors of *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. *Plasmid* **54**: 241–48.

Ohno S. 1970. *Evolution by Gene Duplication*. New York: Springer-Verlag.

Padyana AK, Burley SK. 2003. Crystal structure of shikimate 5-dehydrogenase (SDH) bound to NADP: insights into function and evolution. *Structure* **11**: 1005–13.

Peek J, Christendat D. 2015. The shikimate dehydrogenase family: Functional diversity within a conserved structural and mechanistic framework. *Arch Biochem Biophys* **566C**: 85–99.

Peek J, Garcia C, Lee J, Christendat D. 2013. Insights into the function of Rif12: structural and biochemical investigation of a new shikimate dehydrogenase family protein. *Biochim Biophys Acta* **1834**: 516–23.

Peek J, Lee J, Hu S, Senisterra G, Christendat D. 2011. Structural and mechanistic analysis of a novel class of shikimate dehydrogenases: evidence for a conserved catalytic mechanism in the shikimate dehydrogenase family. *Biochemistry* **50**: 8616–27.

Pittard J, Wallace BJ. 1966. Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **91**: 1494–508.

Ponting CP, Russell RR. 2002. The natural history of protein domains. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**: 45–71.

Rosano G, Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* **5**: 1–17.

Schulz GE, Schirmer RH, Sachsenheimer W, Pai EF. 1978. The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature* **273**: 120–4.

Shanmugaratnam S, Eisenbeis S, Höcker B. 2012. A highly stable protein chimera built from fragments of different folds. *Protein Eng Des Sel* **25**: 699–703.

Singh S, Korolev S, Koroleva O, Zarembinski T, Collart F, Joachimiak A, Christendat D. 2005. Crystal structure of a novel shikimate dehydrogenase from *Haemophilus influenzae*. *J Biol Chem* **280**: 17101–8.

Taylor JS, Raes J. 2004. Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu Rev Genet* **38**: 615–43.

Vogel C, Bashton M, Kerrison ND, Chothia C, Teichmann SA. 2004. Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 208–16.

Wang M, Caetano-Anollés G. 2009. The evolutionary mechanics of domain organization in proteomes and the rise of modularity in the protein world. *Structure* **17**: 66–78.

Wierenga R, Maeyer M, Hol W. 1985. Interaction of pyrophosphate moieties with α -helices in dinucleotide-binding proteins. *Biochemistry* **24**: 13461357.

Ye S, Von Delft F, Brooun A, Knuth MW, Swanson RV, McRee DE. 2003. The crystal structure of shikimate dehydrogenase (AroE) reveals a unique NADPH binding mode. *J Bacteriol* **185**: 4144–51.