



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo de la RNasa Z de *E. coli* en su actividad catalítica nativa y promiscua

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB José Eduardo Olea Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ismael Bustos Jaimes, Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Enrique García Hernández, Instituto de Química, UNAM

Ciudad de México. Julio, 2016



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.

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por las facilidades recibidas para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido (Becario 549818).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento a través de los proyectos 153208 y 252123.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación (PAPIIT DGAPA UNAM) por el financiamiento a través del proyecto IN104210-3.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Proteínas	1
1.2. Metaloenzimas	2
1.3. Promiscuidad catalítica	6
1.4. RNasa Z.....	7
2. Hipótesis.....	11
3. Objetivo.....	12
3.1. Objetivo general	12
3.2. Objetivos particulares.....	12
4. Material y métodos.....	13
4.1. Clonación	13
4.1.1. PCR	13
4.1.2. Digestión	14
4.1.3. Ligación y transformación	15
4.2. Expresión y purificación	17
4.2.1. Estudios de expresión.....	17
4.2.2. Cromatografía de afinidad.....	18
4.2.3. Cromatografía de exclusión molecular	19
4.3. Caracterización cinética	20
4.3.1. Intercambio de los iones metálicos del sitio activo.....	20
4.3.2. Actividad nativa con diferentes metales.....	21
4.3.3. Actividad promiscua con diferentes metales.....	21
5. Resultados y discusión	23

5.1. Clonación	23
5.1.1. PCR	23
5.1.2. Digestión	24
5.1.3. Ligación y transformación	25
5.2. Expresión y purificación	27
5.2.1. Estudios de expresión.....	27
5.2.2. Cromatografía de afinidad.....	28
5.2.3. Cromatografía de exclusión molecular	29
5.3. Caracterización cinética	30
5.3.1. Intercambio de los iones metálicos del sitio activo.....	30
5.3.2. Actividad nativa fosfodiesterasa con diferentes metales.....	32
5.3.3. Actividad promiscua fosfonatasa y monofosfatasa con diferentes metales	35
5.4. Discusión.....	43
6. Resumen de resultados	53
7. Conclusiones	55
8. Bibliografía.....	56
9. Anexos.....	58
9.1. Detalle del análisis de la primera secuenciación (GeneScript)	58
9.1.1. Construcción WT	58
9.1.2. Construcción HT	59
9.2. Detalle del análisis de la segunda secuenciación (Instituto de Ecología, UNAM)	60
9.2.1. Construcción WT	60
9.2.1. Construcción WT	61

Índice de figuras

Figura 1.1 Niveles de organización de la estructura de las proteínas.	1
Figura 1.2 Sitios activos de las metalo- β -lactamasas MIM-1 y MIM-2.	4
Figura 1.3 Preparación de la anhidrasa carbónica sustituida con manganeso.....	4
Figura 1.4 Actividad peroxidasa de la anhidrasa carbónica.....	5
Figura 1.5 Porcentaje de actividad recuperado por la apo-pirazinamidasas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> incubada con diversos metales.....	5
Figura 1.6 Actividad de quinasa y ciclasa de la DHAK de <i>Citrobacter freundii</i>	6
Figura 1.7 Maduración de los extremos 5' y 3' del pre-tRNA.	8
Figura 1.8 Estructura de la RNasa Z de E. coli (PDB ID: 2CBN).	9
Figura 1.9 Estructura de la RNasa Z asociada con tRNA ^{Thr} (PDB ID: 2FK6).	10
Figura 4.1 Reacción de la RNasa Z sobre el TpNPP	19
Figura 5.1 Construcciones utilizadas	23
Figura 5.2 Análisis de los productos de las reacciones de PCR.....	24
Figura 5.3 Análisis de las reacciones de doble digestión con las enzimas <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	24
Figura 5.4 Patrones de digestión de los plásmidos recombinantes con las enzimas <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i> .	25
Figura 5.5 Ensayos de expresión de la RNasa Z mediante los plásmidos recombinantes.	27
Figura 5.6 Ensayos de expresión de la RNasa Z mediante el plásmido recombinante pOH1.	28
Figura 5.7 Cromatografía de afinidad	28
Figura 5.8 Cromatografía de exclusión molecular	29
Figura 5.9 RNasa Z purificada.	30
Figura 5.10 Actividad de fosfodiesterasa en función de la concentración de zinc	31
Figura 5.11 Actividad de fosfodiesterasa en función de la concentración de cobalto	31
Figura 5.12 Actividad de fosfodiesterasa en función de la concentración de níquel	31
Figura 5.13 Actividad de fosfodiesterasa en función de la concentración de cobre	32
Figura 5.14 Afinidad aparente (K_{app}) de la RNasa Z por los iones metálicos estudiados	32
Figura 5.15 Actividad nativa de la enzima incubada con zinc.....	33
Figura 5.16 Actividad nativa de la enzima incubada con cobalto.....	33
Figura 5.17 Actividad nativa de la enzima incubada con níquel.	33
Figura 5.18 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat} para la actividad nativa.	34

Figura 5.19 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la K_m para la actividad nativa.	34
Figura 5.20 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat}/K_m para la actividad nativa.	35
Figura 5.21 Ensayo para detectar actividad promiscua de sulfatasa de la RNasa Z sobre ρ -nitrofenil sulfato (pNPS).	35
Figura 5.22 Ensayo para detectar actividad promiscua de acetato hidrolasa de la RNasa Z sobre ρ -nitrofenil acetato (pNPA).	36
Figura 5.23 Ensayo para detectar actividad promiscua de carbamato hidrolasa de la RNasa Z sobre p -nitrofenil N-bencilcarbamato (pNPC).	36
Figura 5.24 Ensayo para detectar actividad promiscua de monofosfatasa de la RNasa Z sobre ρ -nitrofenil fosfato (pNPP).	36
Figura 5.25 Ensayo para detectar actividad promiscua de fosfonatasa de la RNasa Z sobre p -nitrofenil fenilfosfonato (pNPPPn).	37
Figura 5.26 Actividad promiscua de fosfonatasa de la enzima con zinc.	38
Figura 5.27 Actividad promiscua de fosfonatasa de la enzima con zinc (análisis lineal).....	38
Figura 5.28 Actividad promiscua de fosfonatasa de la enzima con cobalto.	38
Figura 5.29 Actividad promiscua de fosfonatasa de la enzima con níquel.	39
Figura 5.30 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat} para la actividad promiscua de fosfonatasa.	39
Figura 5.31 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la K_m para la actividad promiscua de fosfonatasa.	39
Figura 5.32 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat}/K_m para la actividad promiscua de fosfonatasa.	40
Figura 5.33 Actividad promiscua de monofosfatasa de la enzima con zinc.	40
Figura 5.34 Actividad promiscua de monofosfatasa de la enzima con zinc (análisis lineal).	41
Figura 5.35 Actividad promiscua de monofosfatasa de la enzima con cobalto.	41
Figura 5.36 Actividad promiscua de monofosfatasa de la enzima con níquel.	41
Figura 5.37 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat} para la actividad promiscua de monofosfatsa.	42

Figura 5.38 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la K_m para la actividad promiscua de monofosfatasa.	42
Figura 5.39 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat}/K_m para la actividad promiscua monofosfatasa.	42
Figura 5.40 Reacción catalizada por la RNasa Z, un ejemplo del mecanismo propuesto para las hidrolasas de la familia de las metalo- β -lactamasas.....	44
Figura 5.41 Geometría de coordinación predominante para los cationes divalentes utilizados. ...	45
Figura 5.42 Estabilidad de los complejos de cationes divalentes según las series de Irving-Williams.	46
Figura 5.43 Valores de k_{cat} reportados para la actividad promiscua de fosfonatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPPPn.	47
Figura 5.44 Valores de K_m reportados para la actividad promiscua de fosfonatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPPPn.	47
Figura 5.45 Valores de k_{cat}/K_m reportados para la actividad promiscua de fosfonatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPPPn.	48
Figura 5.46 Valores de k_{cat} reportados para la actividad de monofosfatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPP.	49
Figura 5.47 Valores de K_m reportados para la actividad de monofosfatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPP.	49
Figura 5.48 Valores de k_{cat}/K_m reportados para la actividad de monofosfatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPP.....	50
Figura 5.49 Actividad de fosfodiesterasa para la RNasa Z sustituida con diversos metales	51

Índice de tablas

Tabla 4.1 Oligonucleótidos	13
Tabla 4.2 Mezclas de reacción para PCR.....	14
Tabla 4.3 Mezcla de reacción para doble digestión	15
Tabla 4.4 Mezclas de reacción para ligación	15
Tabla 4.5 Mezcla de reacción para patrones de digestión.....	16
Tabla 4.6 Ensayos cinéticos para actividad nativa	21
Tabla 4.7 Ensayos cinéticos para actividad promiscua fosfonatasa.....	22
Tabla 4.8 Ensayos cinéticos para la actividad promiscua monofosfatasa.....	22
Tabla 5.1 Resultados de la secuenciación	26
Tabla 5.2 Resumen de las constantes cinéticas encontradas.....	43
Tabla 5.5 Características de los iones metálicos utilizados	44
Tabla 5.3 Constantes cinéticas asociadas a la actividad de fosfodiesterasa de la RNasa Z.....	51
Tabla 5.4. Constantes cinéticas asociadas a la actividad promiscua de sulfatasa	52

Abreviaturas

EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
His-Tag	Tag (cola) de histidinas
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry – Time of flight
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pNP	ρ -nitrofenol
pNPA	ρ -nitrofenil acetato
pNPC	ρ -nitrofenil N-bencilcarbamato
pNPP	ρ -nitrofenil fosfato
pNPPPn	ρ -nitrofenil fenilfosfonato
pNPS	ρ -nitrofenil sulfato
TpNPP	<i>timidin-5'-ρ-nitrofenil fosfato</i>

Resumen

En el presente trabajo se estudió a la RNasa Z de *E. coli* con el fin de determinar la existencia de actividades promiscuas sobre sustratos fisiológicos de varios miembros de la misma familia estructural (las metalo- β -lactamasas) y el efecto de otros metales en el sitio activo, con el fin de obtener información sobre su mecanismo enzimático y su función biológica.

La RNasa Z se expresó en células de *E. coli* C41 (DE3) utilizando el vector pOH1 (un vector pET-28c que contenía el gen correspondiente entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*).

Al tratar a la enzima con EDTA se observa una pérdida de la actividad enzimática, misma que se recupera al incubar a la apoenzima en presencia de zinc, cobalto o níquel, pero no al incubarla en presencia de cobre. La afinidad de la enzima por los iones metálicos estudiados aumenta en el siguiente orden: $\text{Ni}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Co}^{2+}$, sin embargo, los valores de K_{app} (constante aparente) no son concluyentes debido a la presencia de la HisTag en la enzima utilizada.

La RNasa Z presenta actividad promiscua de monofosfatasa (sobre pNPP) y fosfonatasa (sobre pNPPPn); no fue posible detectar actividad promiscua de sulfatasa, acetato hidrolasa o carbamato hidrolasa.

La eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) para las reacciones catalizadas por la RNasa Z incubada con diferentes iones metálicos aumenta en el siguiente orden: $\text{Zn}^{2+} < \text{Ni}^{2+} \ll \text{Co}^{2+}$ para la actividad nativa de fosfodiesterasa (sobre TpNPP), $\text{Zn}^{2+} \ll \text{Ni}^{2+} < \text{Co}^{2+}$ para la actividad promiscua de fosfonatasa y $\text{Zn}^{2+} \ll \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+}$ para la actividad promiscua de monofosfatasa.

Debido a que todos los iones metálicos utilizados para modificar la actividad de la RNasa Z poseen una carga de 2^+ y no difieren significativamente en sus radios iónicos, estas características no pueden explicar las diferencias en las constantes cinéticas de la reacción nativa y las reacciones promiscuas. Por el contrario, los iones metálicos utilizados difieren en su capacidad para actuar como ácidos de Lewis, en la geometría de coordinación que pueden adoptar y en la estabilidad de los complejos que forman, siendo estas las características que pueden explicar las diferencias observadas en las constantes cinéticas de la reacción nativa y las reacciones promiscuas.

1. Introducción

1.1. Proteínas

Las proteínas son polímeros de aminoácidos que participan en prácticamente todos los procesos bioquímicos. Su estructura puede describirse en cuatro niveles: la estructura primaria hace referencia a la secuencia lineal de aminoácidos unidos mediante enlace peptídico, la estructura secundaria describe la conformación que adoptan ciertas regiones del polipéptido (por ejemplo, hélice α u hoja β), la estructura terciaria describe el plegamiento global de la cadena polipeptídica y la estructura cuaternaria hace referencia a la asociación de varias cadenas para formar complejos multiméricos.

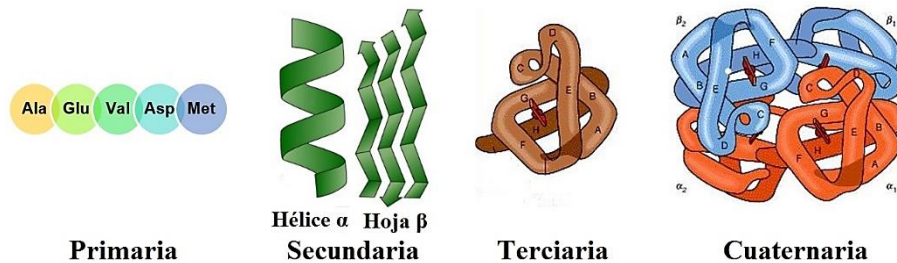


Figura 1.1 Niveles de organización de la estructura de las proteínas.

Las proteínas realizan un gran número de funciones, entre las que se encuentran: funciones de transporte (hemoglobina), regulatorias (hormonas), estructurales (colágeno), almacenamiento (albuminas), catalíticas (enzimas), de defensa (anticuerpos), entre otras. Para llevar a cabo dichas funciones deben interactuar con otras moléculas, por ejemplo; las hormonas interactúan con receptores que desencadenan cascadas de señalización, la hemoglobina interactúa con el oxígeno a través del grupo hemo y las enzimas deben unirse a un sustrato determinado para poder llevar a cabo la catálisis.

Dentro de las funciones que llevan a cabo las proteínas, la función catalítica es una de las más importantes. Las enzimas son catalizadores biológicos que aceleran la velocidad de una reacción al estabilizar el estado de transición, disminuyendo la energía de activación. Ciertas enzimas requieren de cofactores (moléculas de naturaleza no proteica) para llevar a cabo su función. Los cofactores pueden ser moléculas orgánicas unidas covalentemente a la proteína

(grupos prostéticos), moléculas orgánicas unidas a la proteína mediante interacciones no covalentes (coenzimas) o cofactores inorgánicos (iones metálicos); una enzima que incorpora uno o varios iones metálicos como cofactores se denomina metaloenzima.

1.2. Metaloenzimas

Se ha estimado que casi un tercio de las proteínas existentes requieren algún tipo de ión metálico, sin embargo, los requerimientos varían entre los distintos tipos de células y es posible que se hayan modificados a través del tiempo, según la disponibilidad de distintos metales [1]. Dichas estimaciones han sido realizadas basándose en estudios sobre homología estructural, en busca de motivos de unión a metales [2], o mediante metodologías experimentales, utilizando herramientas como MALDI-TOF y/o ICP-MS para analizar la prevalencia de metaloproteínas en un organismo dado [3].

Diversidad de las metaloproteínas

Los iones metálicos son componentes fundamentales de la maquinaria celular, participando en diversas tareas que incluyen la estabilización de la estructura de ácidos nucleicos y proteínas, transducción de señales, catálisis, entre otras; por lo cual pueden ser considerados los cofactores más simples, pero más versátiles de la célula [4]. Diversos ejemplos de las funciones de algunos de los metales más importantes se mencionan a continuación:

El hierro está presente en enzimas que llevan a cabo reacciones que involucran transferencia de electrones, en forma de centros de hierro-azufre, y en el transporte del oxígeno, en forma de grupos hemo. Además, ciertas enzimas, como la nucleótido reductasa y la metano monooxigenasa, son capaces de unir hasta dos átomos de hierro sin la participación de tetrapirrol o azufre.

El zinc, a diferencia del hierro, está presente en solución sólo en un estado de oxidación 2^+ , por lo que no participa en reacciones de óxido-reducción. En cambio, juega un papel importante en la estabilización de la estructura de ciertas proteínas (en los dedos de zinc, por ejemplo) o en la catálisis enzimática, al actuar como un ácido de Lewis (en diversas hidrolasas, metalo- β -lactamasas y polimerasas).

El magnesio es un elemento que puede encontrarse en concentraciones milimolares y a menudo se asocia débilmente a las proteínas, por lo que se encuentra coordinado con ATP o ADP. En cuanto a las enzimas cuyos sustratos se asocian con magnesio es posible mencionar a las DNA polimerasas, ATPasas y quinasas.

Ciertos metales (cobalto, manganeso, molibdeno, vanadio, etc.) son requeridos por un menor número de proteínas, representando menos del 30% de las metaloproteínas, sin embargo, algunas de ellas son abundantes. El cobalto se encuentra primordialmente formando complejos en las diversas formas de cobalaminas (vitamina B12). El níquel se restringe a ciertas enzimas, incluyendo la ureasa, hidrogenasa y algunas superóxido dismutasas. El manganeso es un cofactor importante en ciertas superóxido dismutasas y tiene un papel esencial en las bacterias fotosintéticas.

Coordinación metal-proteína

La proporción de enzimas en cada proteoma que requiere de metales como hierro, magnesio, cobalto o zinc varía entre arqueas, bacterias y eucariotes; además, dentro de cada uno de estos reinos dicho valor tiende a crecer en función de la longitud del genoma analizado. Debido a que las enzimas no son estructuras rígidas, su capacidad para seleccionar el metal adecuado es imperfecta, la unión del ion metálico incorrecto puede involucrar aminoácidos distintos o utilizar una geometría de coordinación diferente, pudiendo inactivar la proteína involucrada en el proceso [5], por lo que, resulta de vital importancia proveer a cada una de ellas con el metal adecuado en el momento correcto.

Si la célula posee mecanismos diversos para asegurar que una enzima reciba un metal específico (plegamiento localizado, transportadores, transcripción en respuesta a metales, metalochaperonas, sensores que detectan la cantidad de metales presentes, entre otros). ¿Cuál es efecto del intercambio de dicho metal por otro?; ¿Este intercambio tendrá consecuencias *in vivo* además de las posibles consecuencias *in vitro*? Los resultados de experimentos de intercambio de iones metálicos pueden mostrar resultados sorprendentes:

Miraula, Schenk y Mitić [6] presentaron un estudio sobre las diferentes reacciones que podrían llevar a cabo las metalo- β -lactamasas MIM-1 y MIM-2 de *Pentatomativorans novosphingobium* y *Agarivorans simiduia* (Figura 1.2), encontrando que además de su actividad de metalo- β -lactamasa, muestran actividad de lactonasa. Dado que estos organismos no son

patógenos, los autores especulan que el papel biológico de dichas enzimas puede estar relacionado con su actividad lactonasa (posiblemente en el proceso de *quorum sensing*) y no con su actividad de metalo- β -lactamasa. El análisis *in vitro* de ambas actividades demostró que al coordinar diferentes iones metálicos a la enzima se modifica únicamente la preferencia de sustrato para la actividad de metalo- β -lactamasa, pero no para la actividad de lactonasa. Los metales Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} son capaces de reconstituir la actividad catalítica en ambos casos, siendo el cobalto el más eficiente. Aunque el contenido *in vivo* de iones metálicos para ambas enzimas no ha sido determinado claramente, es posible que éstas puedan alterar su función dependiendo de los iones metálicos coordinados en sus sitios activos.

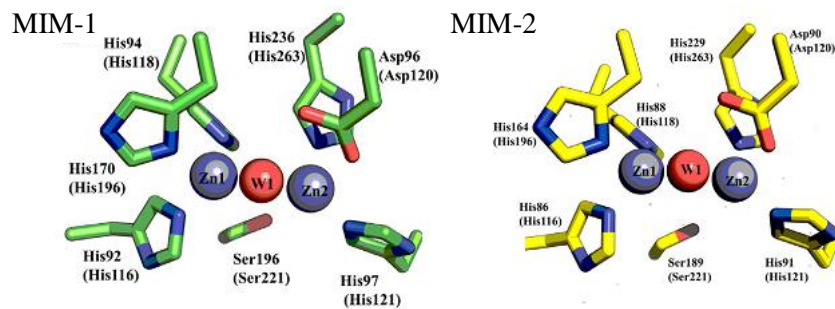


Figura 1.2 Sitios activos de las metalo- β -lactamasas MIM-1 y MIM-2.

(Miraula et al., 2015) [6].

La anhidrasa carbónica es una metaloenzima de zinc cuya función es la conversión de dióxido de carbono en bicarbonato. Okrasa y Kazlauskas [7] reportaron que al sustituir los átomos de zinc del sitio activo por manganeso, la enzima muestra actividad de peroxidasa, a través de un mecanismo dependiente de bicarbonato (Figura 1.3 y Figura 1.4).

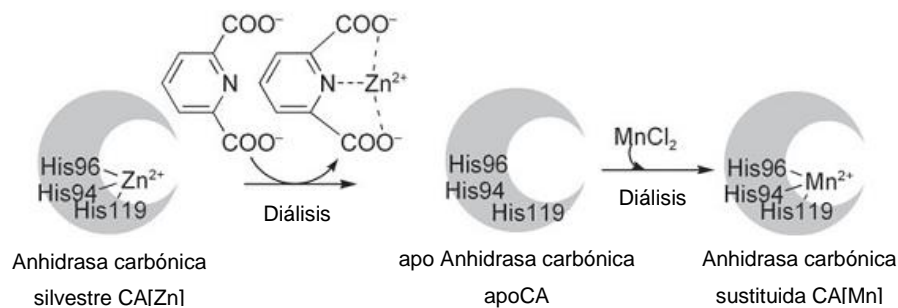


Figura 1.3 Preparación de la anhidrasa carbónica sustituida con manganeso

(Okrasa y Kazlauskas, 2006) [7]

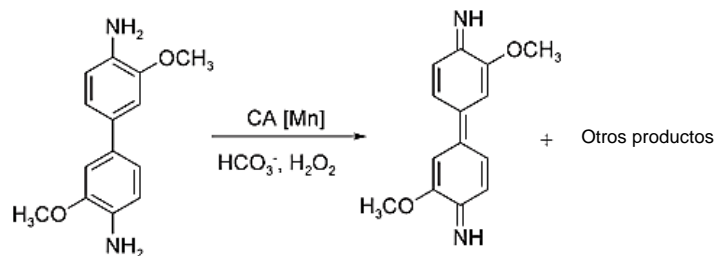


Figura 1.4 Actividad peroxidasa de la anhidrasa carbónica.

(Okrasa y Kazlauskas, 2006) [7].

La pirazinamidasasa de *Mycobacterium tuberculosis* cataliza la conversión de pirazinamida en ácido pirazinoico; Sheen y colaboradores [8] encontraron que se trata de una metaloenzima cuyo nivel de actividad depende del tipo de ión metálico que tiene coordinado. La evidencia muestra que la enzima silvestre coordina preferentemente átomos de zinc, sin embargo, *in vitro*, también es activa al coordinar cobalto y manganeso. Aunque el cobalto y el manganeso recuperan la actividad de la apoenzima, sólo el cobalto es capaz de brindarle una actividad mayor a la de la enzima silvestre, mientras el cobre, hierro y magnesio no restauran su actividad (Figura 1.5).

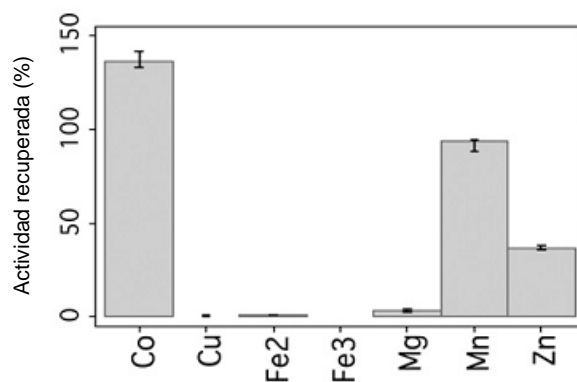


Figura 1.5 Porcentaje de actividad recuperado por la apo-pirazinamidasasa de *Mycobacterium tuberculosis* incubada con diversos metales.

(Sheen et.al., 2012) [8]

Sánchez-Moreno y colaboradores [9] describieron la actividad de la dihidroxiacetona quinasa (DHAK) de *Citrobacter freundii* en presencia de magnesio y manganeso. La enzima cataliza la transferencia del γ -fosfato del ATP a la dihidroacetona y además también cataliza la ciclación del FAD para producir riboflavina 4',5'-fosfato cíclico (4',5'-cFMN). Las eficiencias catalíticas (k_{cat}/K_m) de la DHAK para ambas actividades se encuentran en el mismo orden de

magnitud. Sin embargo, mientras la actividad quinasa no se modifica en gran medida con uno u otro metal, la actividad de ciclasa aumenta casi 50 veces cuando el cofactor usado es Mn^{2+} . Además, a bajas concentraciones de dicho catión la DHAK es capaz de catalizar tanto la fosforilación de la DHA como la ciclación del FAD, sin embargo, a concentraciones mayores a 1.5 mM la actividad de quinasa comienza a ser inhibida, mientras que la actividad de ciclasa alcanza su máximo (Figura 1.6).

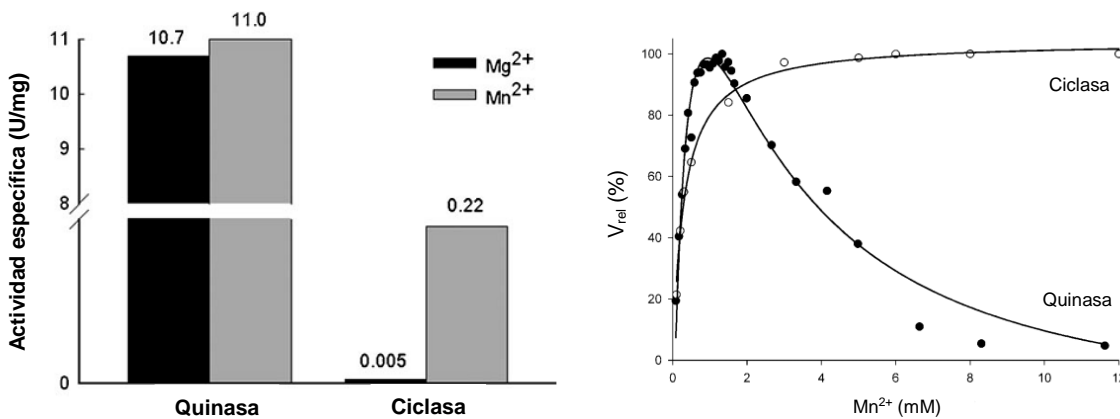


Figura 1.6 Actividad de quinasa y ciclase de la DHAK de *Citrobacter freundii*.

(Sánchez-Moreno et. al., 2009) [9].

1.3. Promiscuidad catalítica

Tradicionalmente las enzimas se han definido como catalizadores extremadamente específicos y eficientes. Sin embargo, desde hace tiempo existen numerosos ejemplos en la literatura que mencionan como muchas enzimas (piruvato descarboxilasa, anhidrasa carbónica, pepsina y quimotripsina, por ejemplo) son capaces de catalizar, generalmente a menor velocidad, reacciones diferentes a aquella para las que están fisiológicamente especializadas, fenómeno conocido como promiscuidad catalítica.

Una tendencia creciente en enzimología apunta a que el estudio sistemático de las posibles actividades promiscuas puede proporcionar información valiosa sobre el mecanismo de acción de la actividad nativa de una enzima dada [10]. Por ejemplo, el descubrimiento de la actividad promiscua de una ribozima de *Tetrahymena thermophila* sobre diésteres de fosfonato proporcionó información clave acerca de la importancia de la geometría del estado de transición y la carga de

los sustratos [11]. Las dos diferencias clave entre la reacción nativa y la promiscua son la geometría del estado de transición y las cargas involucradas. Para evaluar la contribución de estos dos aspectos y entender el mecanismo catalítico de dicha ribozima, se estudió la reacción sobre un sustrato que carecía de una carga negativa, pero compartía la geometría del estado de transición asociado al sustrato nativo. Los diésteres de fosfonato fueron hidrolizados con parámetros cinéticos similares a los de los diésteres de fosfato, demostrando que, en dichas reacciones, la geometría del estado de transición juega un papel de mayor importancia que la carga. Un estudio similar fue llevado a cabo por Olguín *et al* [12] encontrando que la arilsulfatasa de *Pseudomonas aeruginosa* además de hidrolizar monoésteres de sulfato (su actividad nativa) es capaz de hidrolizar monoésteres de fosfato. En esta ocasión las reacciones poseían geometrías y longitudes de enlace similares, pero diferían en la carga de los sustratos y en la identidad de los átomos involucrados en la ruptura/formación de enlaces.

En el presente trabajo se estudió a la RNasa Z de *E. coli* con el fin de determinar la existencia de actividades promiscuas sobre diversos sustratos fisiológicos de otros miembros de la misma familia enzimática (las metalo- β -lactamasas, enzimas que comparten un patrón de plegamiento denominado “sandwich $\alpha\beta/\beta\alpha$ ”) y el efecto de otros metales en el sitio activo, para obtener información sobre su mecanismo enzimático y sus posibles funciones adicionales.

1.4. RNasa Z

Existen tres clases principales de RNA que participan en la síntesis proteica: el RNA mensajero (mRNA) acarrea la información contenida en el DNA para la síntesis proteica, el RNA de transferencia (tRNA) descifra dicha información, contenida en forma de codones, y transporta al aminoácido correspondiente al ribosoma, una estructura formada por RNA ribosomal (rRNA) y proteínas asociadas que se encarga de la síntesis de la nueva cadena polipeptídica [13].

Los tRNAs son sintetizadas como precursores (pre-tRNAs) que deben ser procesados para convertirse en moléculas funcionales [14]; su maduración involucra la eliminación de secuencias en los extremos 5' y 3', el corte y empalme de intrones (en eucariontes), la modificación de nucleótidos y, en ciertos casos, la adición de la secuencia CCA en el extremo 3' [15].

La Figura 1.7 muestra la maduración de los extremos 5' y 3' del pre-tRNA. La remoción de la secuencia del extremo 5' es llevada a cabo por la ribonucleoproteína RNasa P (una

endonucleasa), proceso ampliamente distribuido en los seres vivos [16]. Mientras tanto, la maduración del extremo 3' puede llevarse a cabo mediante dos vías, denominadas exonucleica y endonucleica. En la vía exonucleica la endonucleasa RNasa E remueve parte de la secuencia del extremo 3' y posteriormente la RNasa T o la RNasa PH (dos exonucleasas) remueven los nucleótidos restantes. En cambio, la vía endonucleica ocurre en un solo paso que involucra la remoción de la secuencia del extremo 3' mediante la RNasa Z (una endonucleasa conocida también como 3'-RNasa, ElaC, ZiPD o RNasa BN) [15].

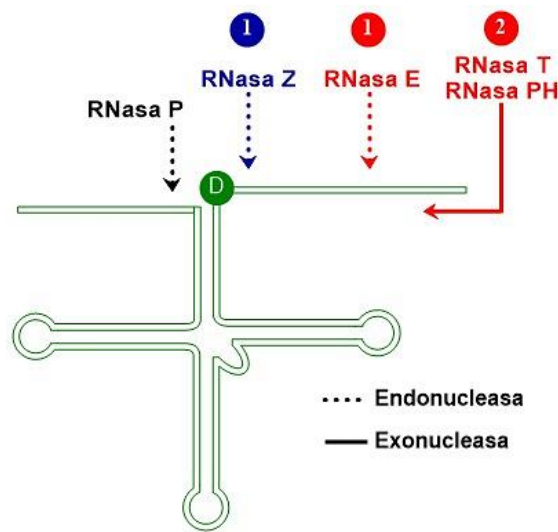


Figura 1.7 Maduración de los extremos 5' y 3' del pre-tRNA.

Se muestra la vía endonucleica en color azul y la vía exonucleica en color rojo.

La RNasa Z es una enzima que forma parte de las metalo- β -lactamasas, una familia enzimática que se caracteriza por adoptar una conformación tridimensional común denominada “sándwich $\alpha\beta/\beta\alpha$ ”, que consiste en un núcleo formado por dos hojas β rodeado por un número variable de hélices α [16,17]. El nombre de la familia enzimática deriva de las β -lactamasas clase B, las proteínas bacterianas donde el plegamiento del “sandwich $\alpha\beta/\beta\alpha$ ” fue identificada por primera vez. Las β -lactamasas utilizan iones de zinc para hidrolizar e inactivar antibióticos β -lactámicos, los cuales inhiben el crecimiento bacteriano al interferir en la síntesis de la pared celular. Además de adoptar un plegamiento similar, las proteínas de la familia de las metalo β lactamasas comparten un patrón de histidinas y aspartatos localizados en cinco motivos

(I a V). El motivo II, que posee la secuencia consenso HXHXDH (donde X indica cualquier aminoácido), es conocido como el “motivo de histidinas” (Motivo His) característico de toda la familia de las metalo- β -lactamasas [16].

La estructura tridimensional de la RNasa Z (Figura 1.8) corresponde a un homodímero en el cual cada monómero contiene un núcleo de dos hojas β rodeado por tres hélices α . Los monómeros se encuentran uno frente al otro facilitando la dimerización mediante interacciones de puente de hidrógeno entre las hélices α de cada uno de ellos. Una característica importante de la RNasa Z es la presencia de un exosito, una especie de brazo flexible que sobresale de la estructura principal de la enzima y participa en la estabilización de las moléculas de pre-tRNA.

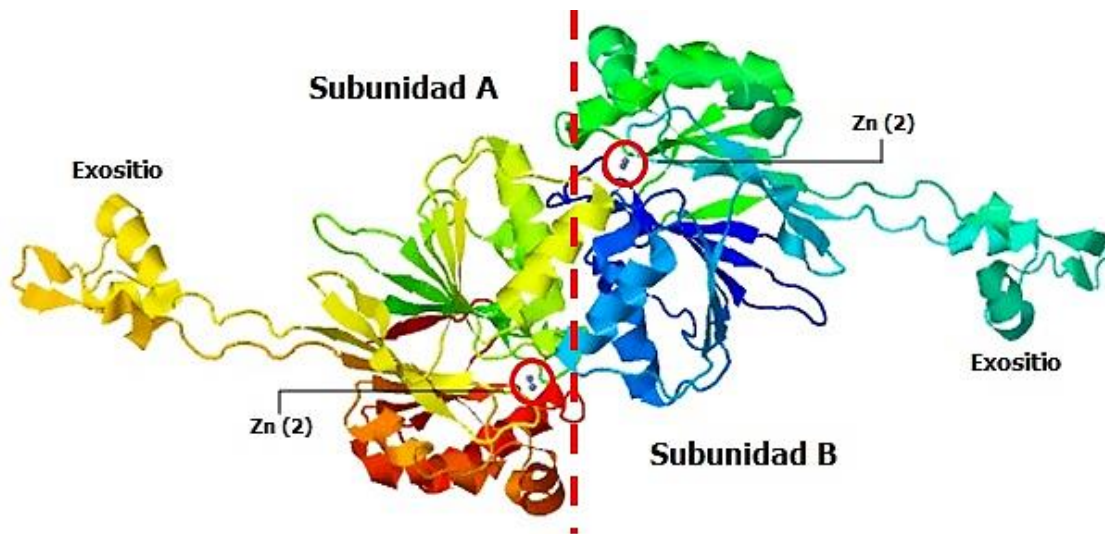


Figura 1.8 Estructura de la RNasa Z de *E. coli* (PDB ID: 2CBN).

La estructura de la RNasa Z unida a tRNA^{Thr} muestra que la enzima es capaz de acomodar dos moléculas de tRNA por homodímero. Cada molécula de tRNA interactúa y se mantiene sujeta por el brazo flexible de una subunidad, mientras el sitio catalítico de la otra subunidad es el que lleva a cabo la reacción enzimática (Figura 1.9).

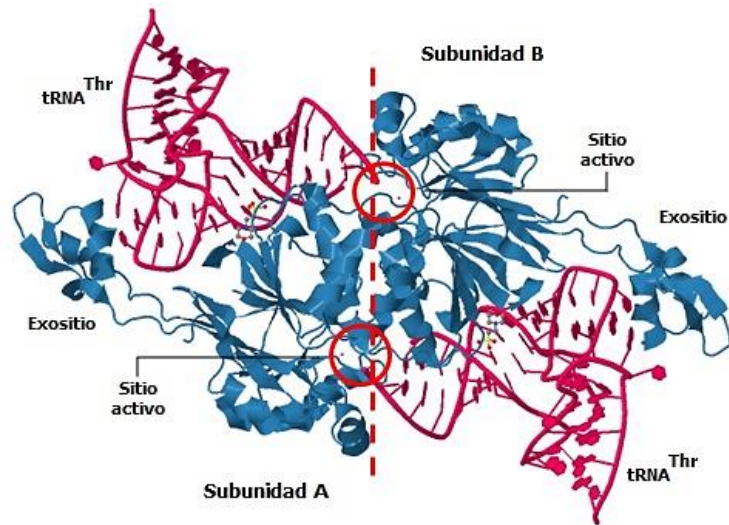


Figura 1.9 Estructura de la RNasa Z asociada con tRNA^{Thr} (PDB ID: 2FK6).

Ciertos estudios sugieren que además de participar en la maduración de pre-tRNAs, la RNasa Z posee funciones adicionales posiblemente relacionadas con el metabolismo de mRNA o rRNA, la función mitocondrial, el desarrollo y la maduración en insectos, entre otros. Por otro lado, las mutaciones en el gen de la RNasa Z^L humana (ELAC2) se han relacionado con la prevalencia del cáncer de próstata, aunque las bases moleculares de dicha relación son desconocidas. Varias mutaciones en la enzima se han analizado *in vitro* y no han conseguido inactivar la capacidad de la misma para procesar tRNAs. Por otro lado, la sobreexpresión de la RNasa Z^L en células tumorales causa un retraso en la progresión de la fase G2 a la fase M y, adicionalmente, se ha demostrado que ésta interactúa con la γ -tubulina. Además, la mutación de ciertos genes que codifican para tRNAs se ha sido asociado con diversos padecimientos como miopatías, encefalopatías, cardiopatías, sordera, etc. [18].

2. Hipótesis

Si la RNasa Z de *E. coli* posee actividad catalítica promiscua será capaz de hidrolizar moléculas que fungen como sustratos fisiológicos para miembros de su misma familia enzimática, metalo- β -lactamasas, debido a que las enzimas de dicha familia poseen sitios activos muy semejantes y adoptan un patrón de plegamiento común. Además, el intercambio de los iones metálicos de su sitio activo modificará tanto su actividad nativa como su perfil de actividades promiscuas, dado el papel primordial que estos juegan en su mecanismo enzimático.

3. Objetivo

3.1. Objetivo general

Determinar, a través de la cinética enzimática, la capacidad de la RNasa Z de *E. coli* para actuar sobre diversos sustratos alternos, mismos que fungen como sustratos fisiológicos para otros miembros de su misma familia enzimática (metalo- β -lactamasas), y estudiar el efecto del intercambio de los metales en el sitio activo, sobre la actividad nativa y promiscua.

3.2. Objetivos particulares

- Clonar el gen de la RNasa Z de *E. coli* generando dos construcciones que permitan obtener a la enzima silvestre y a una enzima recombinante con His-Tag en el extremo N-terminal.
- Caracterizar la actividad nativa de fosfodiesterasa de la RNasa Z utilizando como sustrato al timidin-5'-*p*-nitrofenil fosfato (TpNPP).
- Determinar la existencia de actividades promiscuas de la RNasa Z, sobre los sustratos fisiológicos de diversos miembros de la familia de las metalo- β -lactamasas.
- Caracterizar cinéticamente la o las actividades promiscuas que presente la RNasa Z.
- Determinar el efecto del intercambio de los iones de zinc del sitio catalítico por diversos cationes divalentes en la actividad enzimática de la RNasa Z.

4. Material y métodos

4.1. Clonación

4.1.1. PCR

La amplificación del gen de la RNasa Z de *E. coli* se llevó a cabo mediante PCR, utilizando como templado un vector pET-28c que contenía dicho gen entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* (pOH1) [19]. Con el fin de obtener a la RNasa Z silvestre (construcción WT) y a la RNasa Z con His-Tag en el extremo N-Terminal (construcción HT), se diseñaron tres oligonucleótidos utilizando el programa Serial Cloner 2.6 (Serial Software): un oligonucleótido Sentido con un sitio de restricción para *NdeI* (CATATG) y dos oligonucleótidos Antisentido con un sitio de restricción para *XhoI* (CTCGAG), uno de los cuales (Reverse 2) carece del codón de paro codificado en la secuencia original del gen (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia
Sentido	5' - GACTGAC <u>CATATG</u> GGAATTAATTTTTTTAGGTA CTTCAGCCGGT - 3'
Antisentido 1	5' - TCGA <u>CTCGAG</u> TTAAACGTTAAACACGGTGAAATCATTTCGCCAG - 3'
Antisentido 2	5' - TCGA <u>CTCGAG</u> AACGTTAAACACGGTGAAATCATTTCGCCAGTTC - 3'

Para obtener la primera construcción (WT) se utilizaron los oligonucleótidos Sentido y Antisentido 1, para obtener la segunda construcción (HT), se utilizaron los oligonucleótidos Sentido y Antisentido 2. La mezcla de reacción utilizada en cada caso se describe en la Tabla 4.2:

Tabla 4.2 Mezclas de reacción para PCR

	Volumen (μL)
Agua	30
Buffer KOD Hot Start 10X	5
dNTPs (2 mM c/u)	5
MgSO ₄ (25 mM)	2
Vector pOH1	1
Oligonucleótido Forward (5 μM)	3
Oligonucleótido Reverse* (5 μM)	3
KOD Hot Start DNA Polimerasa (1 U/ μL) (Novagen)	1
Total	50

*Reverse 1 o Reverse 2, según corresponda

Las reacciones de PCR involucraron una desnaturalización inicial a 94 °C / 2 min, seguida por 35 ciclos de 94 °C / 15 s – 64 °C / 30 s – 72 °C / 1 min y un periodo final de extensión a 72 °C / 10 min, llevados a cabo en un termociclador TC-3000 (Techne).

Ambas reacciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE y bromuro de etidio, utilizando una fuente de poder EC 300XL y una cámara para electroforesis B1A (Thermo Scientific). Las bandas correspondientes a cada construcción ($\approx 950\text{pb}$) se extrajeron del gel utilizando el juego de reactivos comerciales AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit (Axygen).

4.1.2. Digestión

Para realizar la clonación de las construcciones WT y HT se utilizó el plásmido pET-22b (Merck), que contiene una secuencia His-Tag en el extremo N-terminal. El plásmido y los productos de PCR se sometieron a una reacción de doble digestión con las enzimas *NdeI* (NEB) y *XhoI* (Fermentas); las condiciones de reacción se determinaron a través de la herramienta Double Digestion Finder™ de NEB; las mezclas de reacción utilizadas se describen en la Tabla 4.3:

Tabla 4.3 Mezcla de reacción para doble digestión

Reactivo	pET-22b (159 ng/μL)	WT (160 ng/μL)	HT (163 ng/μL)
Volumen (μL)			
Agua	7.2	9	9.5
Buffer O*	2	2	2
DNA	6.3	6	5.5
<i>Nde</i> I (10 U/μL)	1.5	1	1
<i>Xho</i> I (10 U/μL)	3	2	2
Total	20	20	20

*Fermentas (Tris-HCl 50 mM (pH 7.5 at 37°C), MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, BSA 0.1 mg/mL)

Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 16 horas, posteriormente se sometieron a un ciclo de inactivación térmica a 80 °C durante 20 minutos y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar la eficacia de las mismas, las bandas correspondientes a los insertos (≈900 pb) y el vector (≈5000 pb) se extrajeron del gel.

4.1.3. Ligación y transformación

Se llevó a cabo una reacción de ligación para cada construcción (WT y HT), utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (NEB) y una relación molar inserto:vector de 3:1. Las mezclas de reacción utilizadas se describen en la Tabla 4.4:

Tabla 4.4 Mezclas de reacción para ligación

Reactivo	WT (18.4 ng/μL)	HT (27.5 ng/μL)
Volumen (μL)		
Agua	11.2	11.7
Buffer Ligasa (NEB)	2	2
Plásmido (10.4 ng/μL)	4.8	4.8
Inserto	1.5	1
T4 DNA Ligasa (1 U/ μL)	0.5	0.5
Total	20	20

Las mezclas de reacción se incubaron a 10 °C durante 16 horas y, posteriormente, se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , siguiendo el procedimiento descrito por Tu et. al. [20]. La cepa DH5 α es la más utilizada en experimentos de clonación debido a que contiene marcadores genéticos que brindan diversas ventajas: soportan el cribaje azul/blanco en medios con X-Gal o Bluo-gal, incrementan la estabilidad del inserto (mediante la mutación rec A1) y mejoran la calidad del DNA plásmidico que se obtiene a partir de ellas (mediante la mutación end A1).

Las colonias transformantes obtenidas se utilizaron para inocular, cada una, un tubo con 3 mL de medio LB-Ampicilina (100 μ g/mL), mismos que se incubaron a 37 °C durante 16 horas con agitación vigorosa (200 rpm). Transcurrido el tiempo de incubación se extrajo el DNA plasmídico de los cultivos utilizando el juego de reactivos comerciales Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (Jena Bioscience), las muestras de plásmido se sometieron a digestión con las enzimas *Nde*I (NEB) y *Xho*I (Fermentas). La mezcla de reacción utilizada para cada muestra se describe en la Tabla 4.5:

Tabla 4.5 Mezcla de reacción para patrones de digestión

Reactivo	Volumen (μ L)
Agua	2
Buffer O	4
DNA (\approx 30 ng/ μ L)	31
<i>Nde</i> I (10 U/ μ L)	1.5
<i>Xho</i> I (10 U/ μ L)	1.5
Total	40

Las reacciones se incubaron durante 2 horas a 37 °C y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa en busca de una banda con la longitud correspondiente a las construcciones WT y HT (\approx 900 pb) y otra correspondiente al vector vacío (\approx 5000 pb).

Las muestras que cumplieron con el patrón de digestión se utilizaron para preparar plásmido recombinante pET-22b (RZWT) y pET-22b (RZHT), a una concentración de 200 ng/ μ L, parte de las cuales fueron enviadas para su secuenciación a la compañía Genescript (EEUU). Al confirmarse que las secuencias de los plásmidos recombinantes eran correctas, las muestras se utilizaron para transformar células de *E. coli* C41 (DE3) con cada uno de los plásmidos recombinantes. La cepa

“DE3” se seleccionó debido a que contienen el gen que codifica para la RNA polimerasa del virus T7, necesaria para la expresión de proteínas recombinantes bajo el sistema pET.

4.2. Expresión y purificación

4.2.1. Estudios de expresión

Para determinar las condiciones ideales para la producción de la RNasa Z se compararon dos métodos de inducción; en el primero de ellos se utilizó una concentración de inductor baja (IPTG 100 μ M), temperatura menor (25 °C) y tiempo de incubación prolongado (16 horas), mientras en el segundo se utilizó una concentración de inductor alta (IPTG 1 mM), temperatura mayor (30 °C) y un tiempo de incubación breve (4 horas).

Las cepas de *E. coli* C41(DE3) transformadas con los plásmidos recombinantes (RZWT y RZHT) se utilizaron para inocular, cada una, 3mL de medio LB-Amp que se incubaron a 37 °C durante 16 horas con agitación vigorosa. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la OD₆₀₀ de una dilución 1/10 de cada cultivo y se agregó, de manera independiente, la cantidad necesaria de cada cultivo para alcanzar una OD₆₀₀ = 0.05 a un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 20 mL de medio LB-Ampicilina (100 μ g/mL). Los matraces se incubaron a 37 °C con agitación vigorosa (200 rpm) hasta alcanzar una OD₆₀₀ \approx 0.7, momento en el cual se agregó el inductor a la concentración adecuada y se establecieron las condiciones de temperatura para cada método de inducción.

Se recolectaron muestras de cada cultivo a diferentes tiempos y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10% (SDS-PAGE) utilizando una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad) y una fuente de poder PowerPac® Basic (Bio-Rad) aplicando un voltaje de 120V durante 120 minutos.

Los resultados del análisis no mostraron evidencia de sobreexpresión de la proteína recombinante, lo que se manifestó por la ausencia de una banda de mayor intensidad, de alrededor de 35 kD, en el gel de poliacrilamida. Debido a esto, se efectuaron nuevos experimentos de inducción utilizando diferentes cepas para expresión y el plásmido pOH1 como control, ya que se había comprobado previamente que las cepas transformadas con dicho plásmido eran capaces de sobreexpresar a la RNasa Z en las condiciones evaluadas [19].

Durante los experimentos efectuados no fue posible detectar la sobreexpresión de la proteína recombinante en ninguna de las cepas transformadas con los plásmidos pET-22b (RZWT) y pET-22b (RZHT), a pesar de que una segunda secuenciación había confirmado que la clonación del gen de la RNasa Z había sido exitosa (Anexo 9.2), por lo cual se decidió trabajar con el plásmido POH1 para la producción de la enzima recombinante debido a que durante los experimentos de inducción solo en las cepas transformadas con dicho plásmido fue posible detectar la sobreexpresión de la enzima.

La producción de la proteína recombinante a nivel matraz se realizó utilizando una cepa de *E. coli* C41 (DE3) transformada con el plásmido pOH1, IPTG 100 μ M e incubación durante 16 horas a 25 °C, siguiendo la metodología descrita previamente, con 500 mL de medio LB-Kanamicina (50 μ g/mL) en un matraz Erlenmeyer de 2 L. Transcurrido el tiempo de inducción las células se recuperaron por centrifugación a 10000 rpm durante 2 minutos en una centrífuga Heraeus Megafuge 16 (Thermo Scientific), obteniendo 6 pellets que se almacenaron a -20 °C. Para obtener el extracto crudo, se resuspendieron dos pellets en 20 mL de Buffer de Bajo Imidazol (NaCl 250 mM, Imidazol 25 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4) y se sonicaron en un equipo Sonicator® 3000 (Misonix) en ciclos alternados de sonicado(2 s)/reposo(2 s) a una potencia de 4 W hasta alcanzar 8 minutos de sonicación. Posteriormente la muestra se centrifugó a 15000 rpm durante 45 minutos a 4 °C en una centrifuga J-QA27 (Beckman Coulter), se desechó el pellet y el sobrenadante (extracto crudo), se filtró utilizando filtros para jeringa de 0.45 μ m y 0.2 μ m consecutivamente, finalmente el extracto crudo clarificado se almacenó a 4 °C hasta su purificación.

4.2.2. Cromatografía de afinidad

Para llevar a cabo la cromatografía de afinidad se utilizó una columna His-Trap® HP de 1mL (GE Healthcare), la cual se equilibró con 3 mL del Buffer de Bajo Imidazol (NaCl 250 mM, Imidazol 25 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4), posteriormente se inyectó la muestra de proteína (extracto crudo clarificado), se lavó con 3mL adicionales de Buffer de Bajo Imidazol y se eluyó con 3 mL de Buffer de Alto Imidazol (NaCl 250 mM, Imidazol 250 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4). La fracción eluída (3 mL) se llevó a un volumen de 500 μ L utilizando un filtro para centrifuga Amicon® Ultra 0.5 mL 10K (Millipore) y se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular, como se describe a continuación.

4.2.3. Cromatografía de exclusión molecular

Para llevar a cabo la cromatografía de exclusión molecular se utilizó un equipo HPLC Serie 20 con Detector UV (Shimadzu), que proporcionó un flujo de 0.5 mL/min, y una columna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). La columna se equilibró con 25 mL del Buffer GFC (Tris-HCl 50 mM pH 7.4), posteriormente se inyectó la muestra de proteína (fracción eluida proveniente de la cromatografía de afinidad) y se eluyó con 25 mL adicionales de Buffer GFC.

Fracciones representativas de cada región del cromatograma se analizaron mediante un ensayo enzimático en una placa de 96 pozos, utilizando como sustrato timidin-5'-*p*-nitrofenil fosfato (TpNPP) 5 mM en Buffer de Ensayo (Tris-HCl 200 mM pH 7.4), monitoreando la formación de *p*-nitrofenol (pNP) mediante la aparición de una coloración amarilla (Figura 4.1).

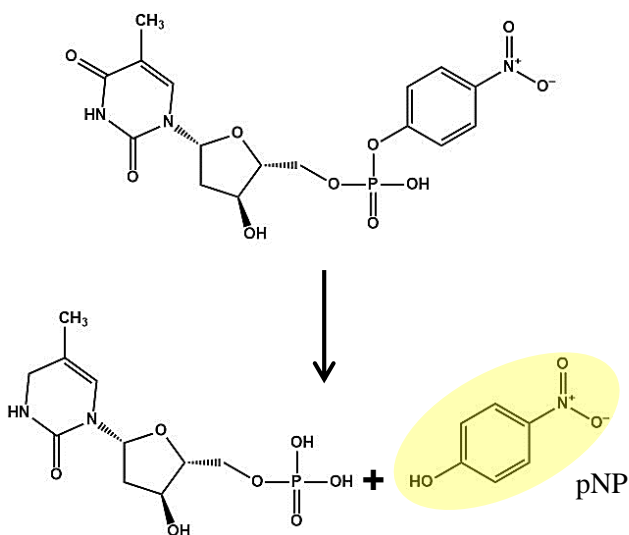


Figura 4.1 Reacción de la RNasa Z sobre el TpNPP

Las fracciones que arrojaron un resultado positivo en el ensayo enzimático y que correspondían al pico principal de cromatograma, se mezclaron para llevar a cabo los experimentos de intercambio de iones metálicos y actividad enzimática. La concentración de la enzima se determinó utilizando un coeficiente de absorptividad molar teórico (basado en la secuencia de aminoácidos) $\epsilon_{280\text{nm}} = 20948.5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calculado utilizando la herramienta ProtParam (Swiss Institute of Bioinformatics) [21]; en el cálculo se consideró la presencia de la His-Tag y la secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV.

4.3. Caracterización cinética

4.3.1. Intercambio de los iones metálicos del sitio activo

Con el fin de remover los iones metálicos del sitio activo, una muestra de enzima 30 μM se incubó a 25 °C durante una hora con EDTA 30 mM, posteriormente se realizó un lavado de la muestra con seis volúmenes de Buffer de Ensayo, de manera alternada, en un filtro para centrifuga Amicon® Ultra 0.5 mL 10K (Millipore). La muestra de apoenzima se sometió, de manera independiente, a diferentes concentraciones de zinc (ZnCl_2 0-1 mM), cobalto (CoSO_4 0-2 mM), cobre (CuCl_2 0-10 mM) y níquel (NiCl_2 0-10 mM) durante 2 horas a 25 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la actividad enzimática de fosfodiesterasa sobre TpNPP 5 mM en Buffer de Ensayo, a cada concentración de metal agregado, a través de ensayos espectrofotométricos continuos, utilizando un espectrofotómetro Cary Win 50 (Varian) monitoreando la formación de pNP a 400 nm. La absorbancia se monitoreó en un rango de 350-450 nm cada 30 segundos durante 5 minutos, posteriormente se calculó la velocidad inicial de cada reacción, en nM/s, utilizando la pendiente de las gráficas de absorbancia_{400nm} en función del tiempo (m_{400nm}) y un coeficiente de absortividad molar $\epsilon_{400nm} = 10270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el pNP [19], como indica la Ecuación 1:

Ecuación 1. Cálculo de la velocidad inicial

$$V_0 = \frac{m_{400nm}(\text{min}^{-1}\text{cm}^{-1})}{10270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}} \cdot \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} \cdot \frac{1 \times 10^9 \text{ nM}}{1 \text{ M}}$$

Los valores de velocidad inicial obtenidos se analizaron utilizando el programa Graphpad Prism® 6.01 (Graphpad Software) y se ajustaron al modelo descrito por la Ecuación 2.

Ecuación 2. Velocidad inicial en función de la concentración de metal

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [M]}{K_{app} + [M]}$$

Con base en los resultados obtenidos fue posible determinar una concentración de metal a la cual se obtenía la mayor actividad enzimática: 1 mM para zinc, 2 mM para cobalto y 10 mM para níquel; misma que fue utilizada para los experimentos de actividad nativa y promiscua.

4.3.2. Actividad nativa con diferentes metales

El estudio de la actividad nativa de fosfodiesterasa de la RNasa Z sobre timidin-5'-*p*-nitrofenil fosfato (TpNPP) se llevó a cabo mediante ensayos espectrofotométricos continuos, monitoreando la formación de *p*-nitrofenol (pNP) en Buffer de Ensayo. Para determinar los parámetros cinéticos asociados a la actividad nativa de la enzima incubada a las concentraciones óptimas de cada uno de los metales estudiados, se efectuaron, para cada metal, ensayos cinéticos a una concentración 50 nM de enzima y diferentes concentraciones de sustrato, según se indica en la Tabla 4.6:

Tabla 4.6 Ensayos cinéticos para actividad nativa

Reactivo	Sustrato (TpNPP)					
	1 mM	2 mM	3 mM	5 mM	10 mM	15 mM
Buffer de Ensayo	52	50	48	44	34	24
TpNPP (30 mM)	2	4	6	10	20	30
Enzima (500 nM)	6	6	6	6	6	6

Los ensayos se monitorearon de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 4.3.1 y los valores de velocidad inicial obtenidos para los ensayos con cada uno de los metales se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten.

4.3.3. Actividad promiscua con diferentes metales

Para determinar la presencia de actividades promiscuas en la RNasa Z, se efectuaron ensayos enzimáticos de punto final sobre sustratos nativos de otros miembros de la familia de las metalo- β -lactamasas, dando preferencia a aquellos en cuya reacción se lleva a cabo la liberación de pNP, con el fin de monitorear dichas reacciones mediante espectrofotometría UV-Visible.

Con base en los resultados obtenidos se procedió a la caracterización cinética de la actividad promiscua de fosfonatasa sobre *p*-nitrofenil fenilfosfonato (pNPPPn) y la actividad promiscua de monofosfatasa sobre *p*-nitrofenil fosfato (pNPP).

Para determinar los parámetros cinéticos asociados a la actividad promiscua fosfonatasa, se efectuaron, para cada metal, ensayos a una concentración 100 nM de enzima y diferentes concentraciones de sustrato (pNPPPn), según se indica en la Tabla 4.7:

Tabla 4.7 Ensayos cinéticos para actividad promiscua fosfonatasa

Reactivo	Sustrato (pNPPPn)					
	1 mM	5 mM	10 mM	15 mM	20 mM	30 mM
	Volumen (μ L)					
Buffer de Ensayo	52.7	47.3	40.7	34	27.3	14
pNPPn (45 mM)	1.3	6.7	13.3	20	26.7	40
Enzima (1 μ M)	6	6	6	6	6	6

Así mismo, para determinar los parámetros cinéticos asociados a la actividad promiscua monofosfatasa, se efectuaron, para cada metal, ensayos a una concentración 1.5 μ M de enzima y diferentes concentraciones de sustrato (pNPP), según se indica en la Tabla 4.8Tabla 4.1:

Tabla 4.8 Ensayos cinéticos para la actividad promiscua monofosfatasa

Reactivo	Sustrato (pNPP)					
	1 mM	5 mM	10 mM	15 mM	20 mM	30 mM
	Volumen (μ L)					
Buffer de Ensayo	52.7	47.3	40.7	34	27.3	14
pNPP (45 mM)	1.3	6.7	13.3	20	26.7	40
Enzima (15 μ M)	6	6	6	6	6	6

En ambos casos los ensayos se monitorearon de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 4.3.1 y los valores de velocidad inicial obtenidos para los ensayos con cada uno de los metales se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten.

5. Resultados y discusión

5.1. Clonación

5.1.1. PCR

La amplificación del gen de la RNasa Z de *E. coli* se llevó a cabo mediante PCR, utilizando como templado al vector pOH1 (un vector pET-28c que contenía dicho gen entre los sitios de restricción *Nde*I y *Xho*I) [19] y generando dos construcciones: la enzima silvestre (WT) y una enzima recombinante con His-Tag en el extremo N-terminal (HT).

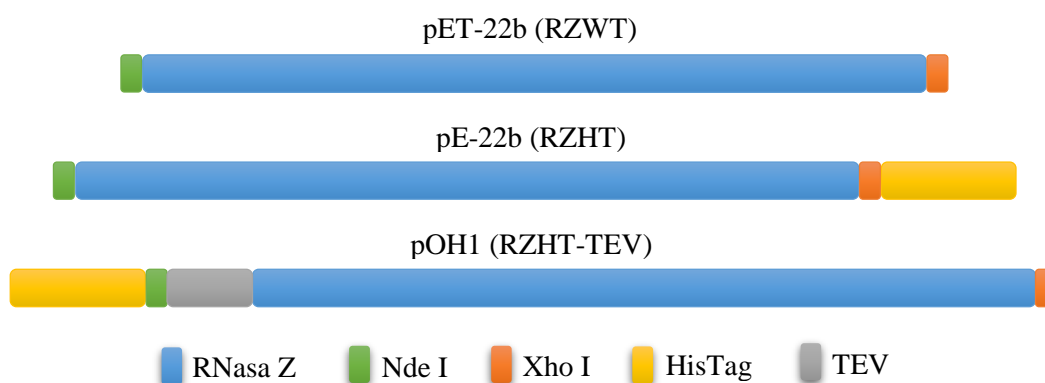


Figura 5.1 Construcciones utilizadas

La secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV (ENLYFQ[G/S]) está presente en la construcción que se obtiene a partir del plásmido pOH1

Al analizar el producto de las reacciones de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 5.2), es posible observar que se generan bandas que corresponden a la longitud esperada para ambas construcciones (≈ 900 pb).

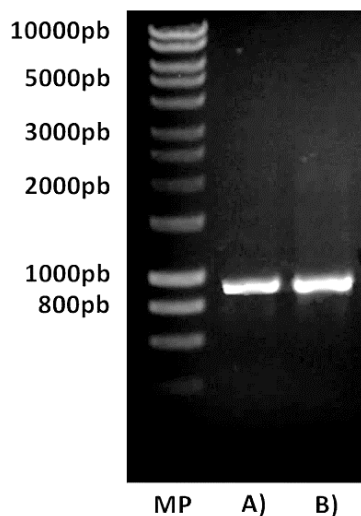


Figura 5.2 Análisis de los productos de las reacciones de PCR

MP) Marcador de peso. A) WT. B) HT

5.1.2. Digestión

Al analizar el producto de las reacciones de doble digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 5.3), es posible observar que cada digestión genera solamente una banda de aproximadamente 900 pb para ambas construcciones y de aproximadamente 5000 pb para el vector vacío.

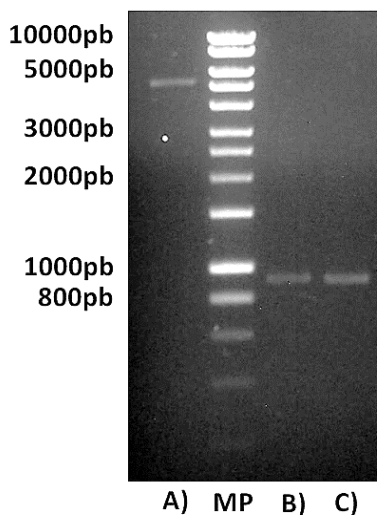


Figura 5.3 Análisis de las reacciones de doble digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI*

A) pET-22b. MP) Marcador de peso. B) WT. C) HT.

Las bandas correspondientes al plásmido digerido ($\approx 5000\text{pb}$ en el carril A) y a las construcciones digeridas ($\approx 900\text{pb}$ en los carriles B y C), se extrajeron del gel y se purificaron para su uso en las reacciones de ligación.

5.1.3. Ligación y transformación

Se llevaron a cabo reacciones de ligación entre el plásmido digerido y cada una de las construcciones, utilizando una relación molar inserto:vector de 3:1. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , generando colonias transformantes, a partir de las cuales se obtuvieron muestras de plásmido a las que se les practicó un patrón de digestión, con las enzimas utilizadas para la clonación (*NdeI* y *XhoI*).

Al analizar los patrones de digestión obtenidos con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, es posible observar que las muestras de plásmido cumplen con el patrón predicho (bandas a $\approx 5000\text{pb}$ y $\approx 900\text{pb}$) y, por tanto, contienen, entre los sitios *NdeI* y *XhoI*, una secuencia de $\approx 900\text{pb}$ que puede corresponder al inserto.

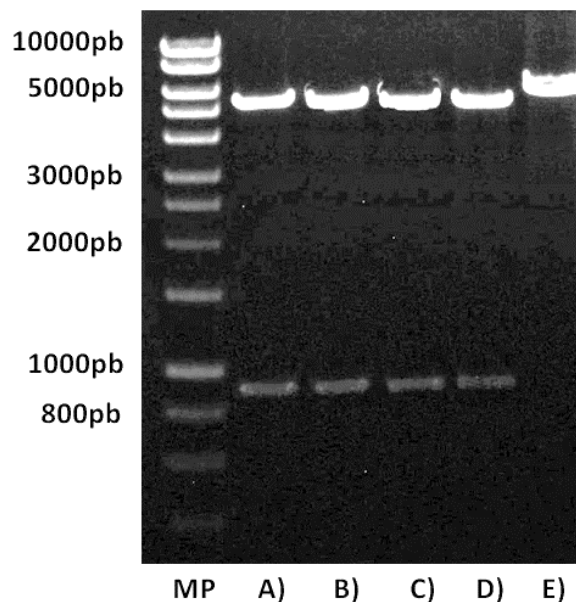


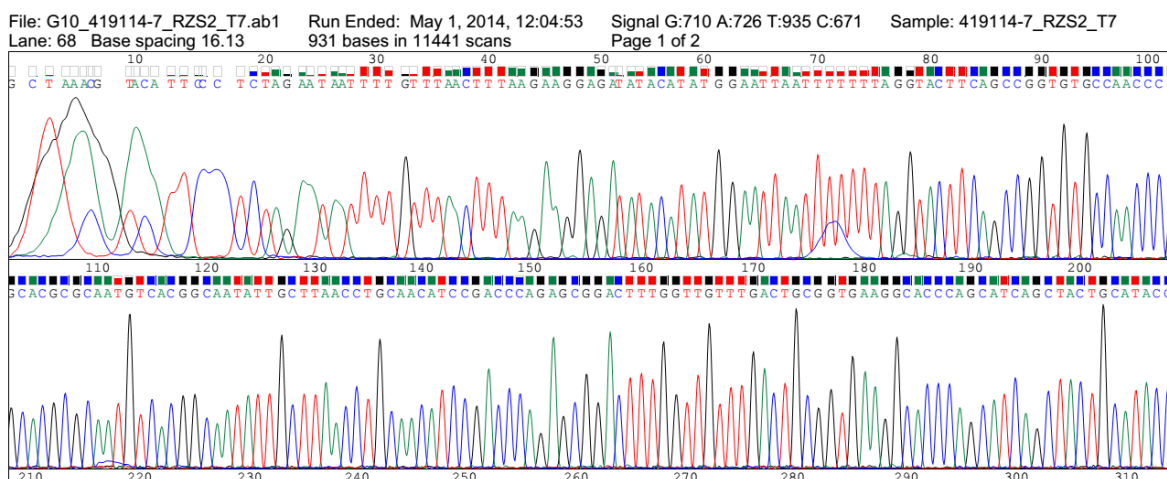
Figura 5.4 Patrones de digestión de los plásmidos recombinantes con las enzimas *NdeI* y *XhoI*

MP) Marcador de peso. A) y B) WT. C) y D) HT. E) Plásmido pET-22b

Las muestras que cumplieron con el patrón de digestión fueron enviadas para su secuenciación, con los oligonucleótidos correspondientes al Promotor T7 y al Terminador T7, a la compañía Genescript (EEUU), las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia del gen de la RNasa Z de *E. coli* utilizando el programa Serial Cloner 2.6 (Serial Software), los resultados obtenidos confirmaron que la clonación había sido exitosa,

Tabla 5.1 Resultados de la secuenciación

Construcción	Secuenciación	Identidad	Identidad (Gen)
WT	Promotor T7	872/918 (94.99 %)	918/918 (100 %)
	Terminador T7	844/927 (91.05 %)	918/918 (100 %)
HT	Promotor T7	875/918 (95.32 %)	918/918 (100 %)
	Terminador T7	872/947 (92.08 %)	918/918 (100 %)



El porcentaje de identidad de las secuencias es menor a 100 % debido a que la secuenciación incluye bases presentes en el vector utilizado (desde el Promotor T7 y hasta el Terminador T7) pero ausentes en el gen de la RNasa Z. Los resultados completos de las alineaciones efectuadas se presentan en el Anexo 9.1.

Los plásmidos recombinantes se identificaron como pET-22b (RZWT) y pET-22b (RZHT), mismos que se utilizaron para transformar células de *E. coli* C41 (DE3).

5.2. Expresión y purificación

5.2.1. Estudios de expresión

Se estudiaron dos condiciones de inducción para la enzima silvestre (RZWT) y la enzima con HisTag (RZHT), las cuales diferían en la concentración de inductor y el tiempo/temperatura de inducción. Durante el tiempo de inducción se recolectaron muestras de cada cultivo a diferentes tiempos, mismas que se analizaron mediante SDS-PAGE.

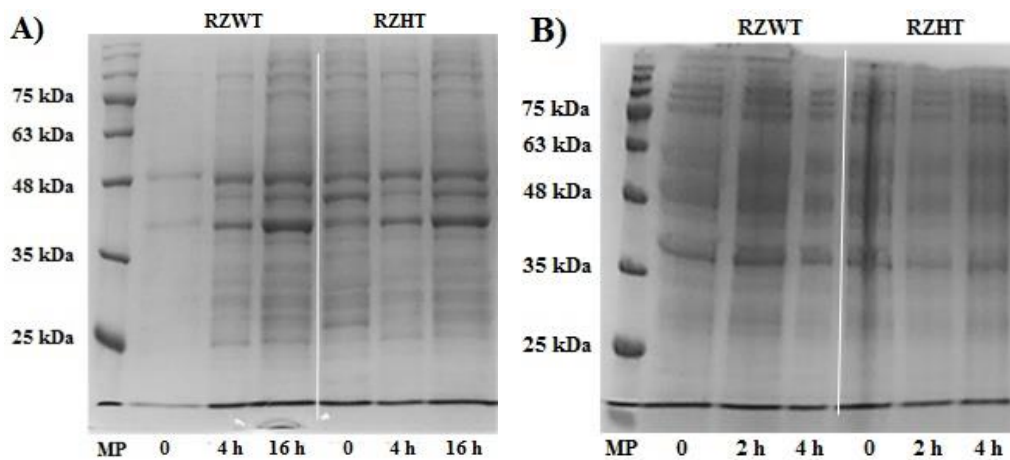


Figura 5.5 Ensayos de expresión de la RNasa Z mediante los plásmidos recombinantes.

A) Inducción 1: 25 °C - IPTG 100 μ M - 16 h. B) Inducción 2: 30 °C - IPTG 1 mM - 4 h.

Los ensayos de inducción no muestran evidencia de sobreexpresión de la proteína recombinante, lo que se manifestó por la ausencia de una banda de mayor intensidad, alrededor de 35 kD, en los geles de poliacrilamida.

Se decidió efectuar nuevos experimentos de inducción utilizando las cepas para expresión BL21 (DE3), C41 (DE3) y el plásmido recombinante POH1 como control. Durante dichos experimentos únicamente fue posible detectar la sobreexpresión de la proteína recombinante en las cepas transformadas con el plásmido pOH1 pero no en las cepas transformadas con los plásmidos pET-22b (RZWT) y pET-22b (RZHT), a pesar de que una segunda secuenciación había confirmado que la clonación el gen de la RNasa Z se había insertado en el sentido correcto entre los sitios *Nde*I y *Xho*I del plásmido pET-22b y su secuencia era correcta (Anexo 9.2).

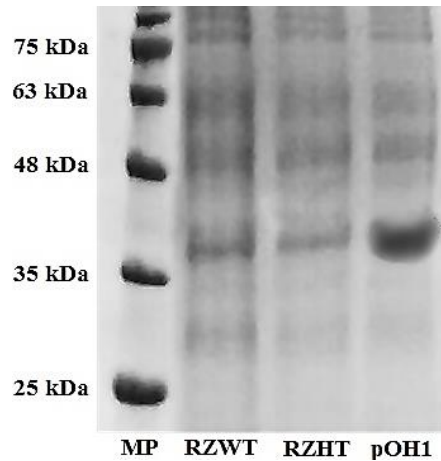
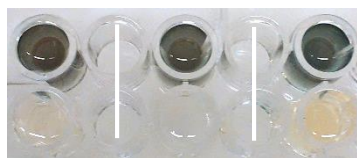


Figura 5.6 Ensayos de expresión de la RNasa Z mediante el plásmido recombinante pOH1.

Con base en dichos resultados, la producción de la proteína recombinante a nivel matraz se realizó utilizando la cepa de *E. coli* C41 (DE3) transformada con el plásmido pOH1, IPTG 100 μ M e incubación durante 16 horas a 25 °C.

5.2.2. Cromatografía de afinidad

Como primer paso para la purificación de la enzima se realizó una cromatografía de afinidad de forma manual (mediante jeringa), donde se utilizó una columna His-Trap® HP de 1mL (GE Healthcare) equilibrada con Buffer de Bajo Imidazol (20 mM). La muestra (extracto crudo clarificado) se inyectó a la columna y se eluyó utilizando Buffer de Alto Imidazol (250 mM).



Extracto crudo No retenido Fracción eluída

Figura 5.7 Cromatografía de afinidad

Análisis de diversas fracciones mediante el reactivo de Bradford y el ensayo enzimático sobre TpNPP

La muestra correspondiente al extracto crudo presenta una coloración azul utilizando el reactivo de Bradford y una coloración amarilla en el ensayo enzimático, debido a que contiene el total de proteínas solubles en la célula, incluyendo a la RNasa Z. La fracción no retenida presenta una coloración azul en el ensayo de Bradford ya que contiene las proteínas solubles de la célula,

mientras la RNasa Z se encuentra unida a la columna, por lo cual el resultado del ensayo enzimático es negativo. Finalmente, la fracción eluída presenta una coloración azul en el ensayo de Bradford y una coloración amarilla en el ensayo enzimático, debido a que la RNasa Z se encuentra presente con alta pureza y concentración.

5.2.3. Cromatografía de exclusión molecular

Para refinar la purificación de la enzima se realizó una cromatografía de exclusión molecular, donde se utilizó una columna Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), un equipo HPLC Serie 20 con Detector UV (Shimadzu) y Buffer GFC (Tris-HCl 50 mM pH 7.4) a un flujo de 0.5 mL/min (Figura 5.8).

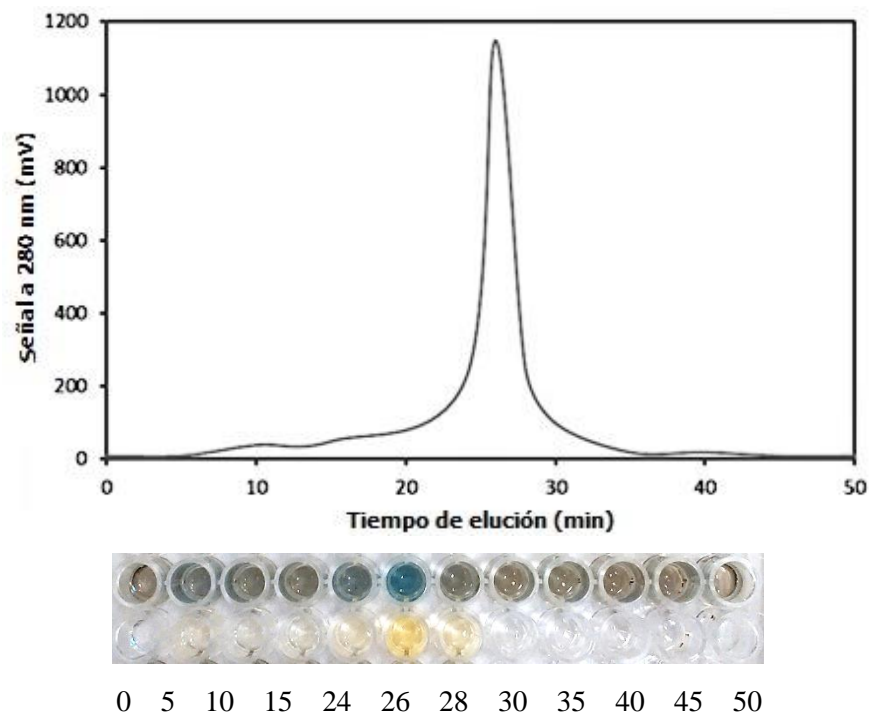


Figura 5.8 Cromatografía de exclusión molecular

Cromatograma obtenido y análisis de diversas fracciones mediante el reactivo de Bradford y el ensayo enzimático sobre TpNPP

Aunque la muestra proveniente de la cromatografía de afinidad contiene a la RNasa Z con una pureza aceptable, la cromatografía de exclusión molecular es capaz de separarla de ciertas proteínas contaminantes que se encuentran en una baja concentración, las cuales se obtienen en los primeros minutos de la elución. Con base en los resultados obtenidos, se decidió mezclar las

fracciones 25, 26 y 27 para efectuar los ensayos enzimáticos, debido a que contienen a la RNasa Z en mayor concentración y pureza (Figura 5.9).

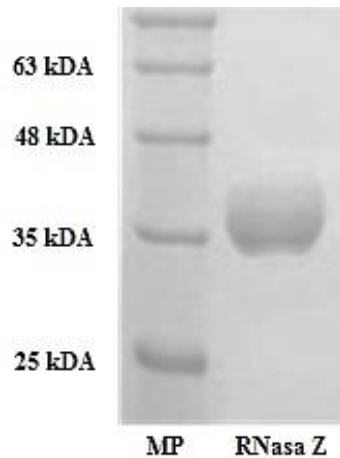


Figura 5.9 RNasa Z purificada.

5.3. Caracterización cinética

5.3.1. Intercambio de los iones metálicos del sitio activo

Para retirar los metales del sitio activo, la enzima se trató con EDTA a 25 °C durante una hora, posteriormente se realizó un lavado exhaustivo con buffer sin EDTA y finalmente la muestra se sometió, de manera independiente, a diferentes concentraciones de zinc, cobalto, cobre y níquel a 25 °C durante 2 horas.

El tratamiento con EDTA es eficiente ya que resulta en la pérdida de la actividad enzimática, mientras que la incubación con zinc, cobalto y níquel logra recuperar dicha actividad en diferente medida, dependiendo del ion metálico agregado. Sin embargo, la incubación con cobre en concentraciones 0.5 a 10 mM solamente recupera una fracción muy pequeña de la actividad y ésta no presenta una tendencia uniforme. Los experimentos de intercambio de metales se ajustaron a la Ecuación 2 y los resultados se muestran en las Figuras Figura 5.10 a Figura 5.13.

Cabe mencionar que la adición de una concentración mayor del metal correspondiente no mejora la actividad obtenida, e incluso, tiene un efecto negativo sobre ésta. Por lo que, en cada caso, se determina una concentración ideal para la incubación, después de la cual es posible que la unión inespecífica de los iones metálicos afecte la estabilidad de la proteína, disminuyendo su actividad.

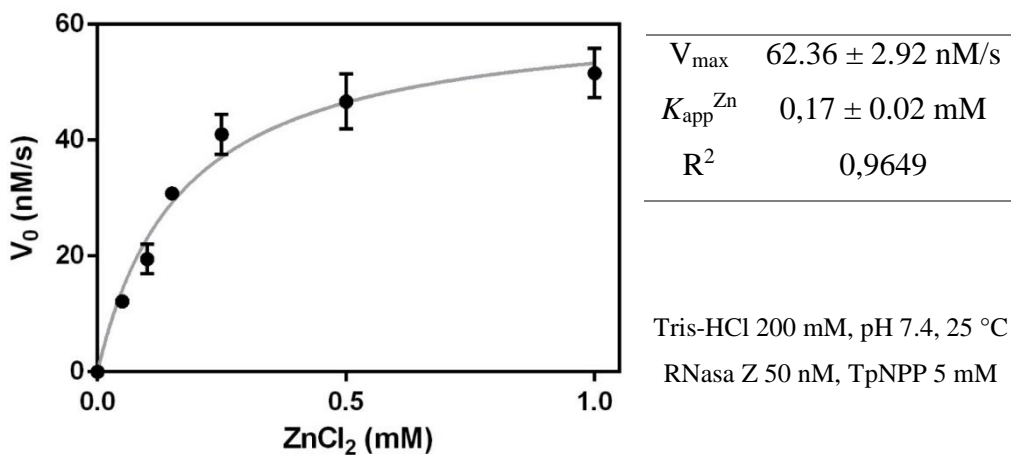


Figura 5.10 Actividad de fosfodiesterasa en función de la concentración de zinc

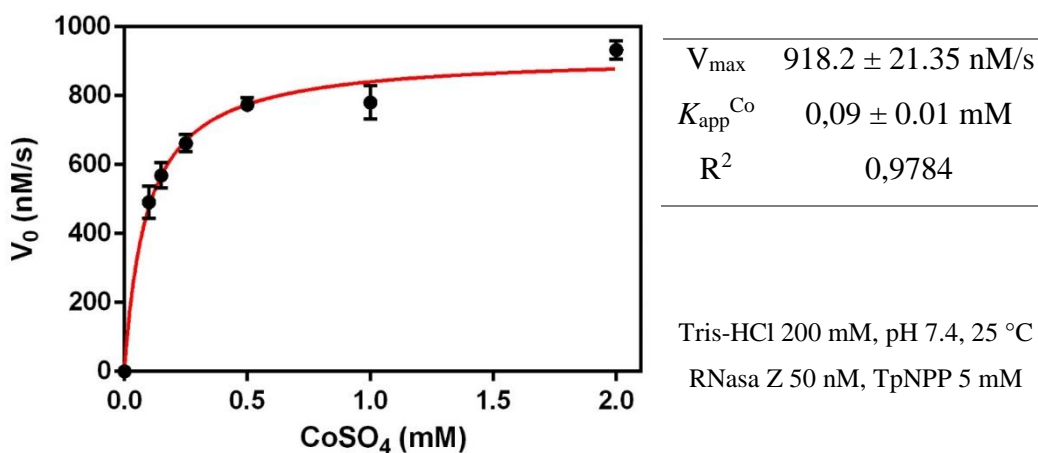


Figura 5.11 Actividad de fosfodiesterasa en función de la concentración de cobalto

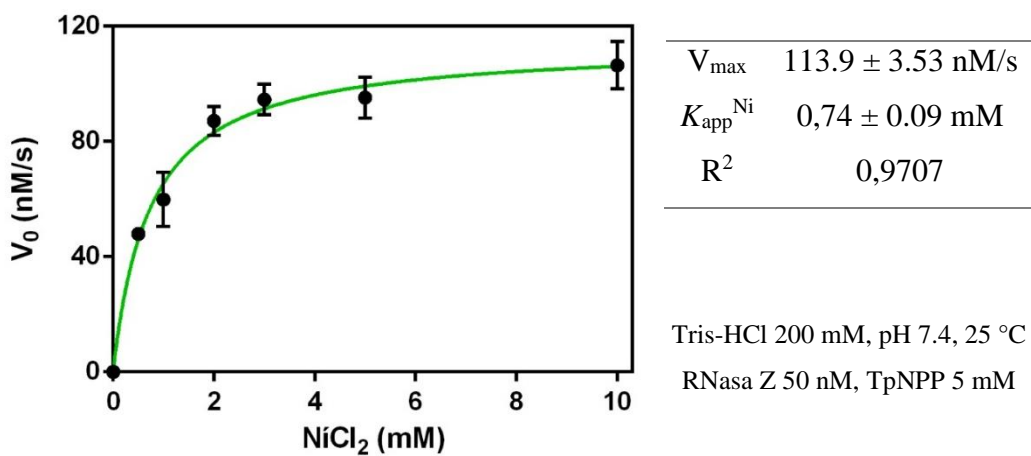


Figura 5.12 Actividad de fosfodiesterasa en función de la concentración de níquel

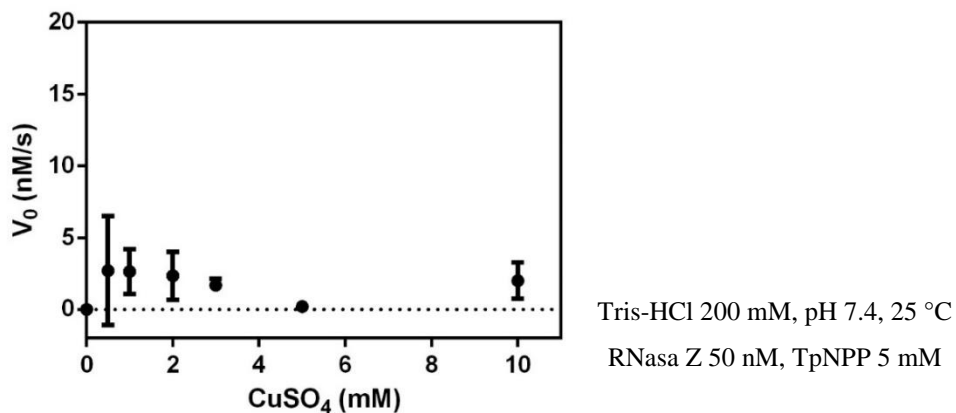


Figura 5.13 Actividad de fosfodiesterasa en función de la concentración de cobre

Con base a los resultados obtenidos se los ensayos enzimáticos posteriores se efectuaron a la concentración de cada metal a la cual se obtenía la mayor actividad enzimática: 1 mM de ZnCl₂, 2 mM de CoSO₄ y 10 mM de NiCl₂, respectivamente.

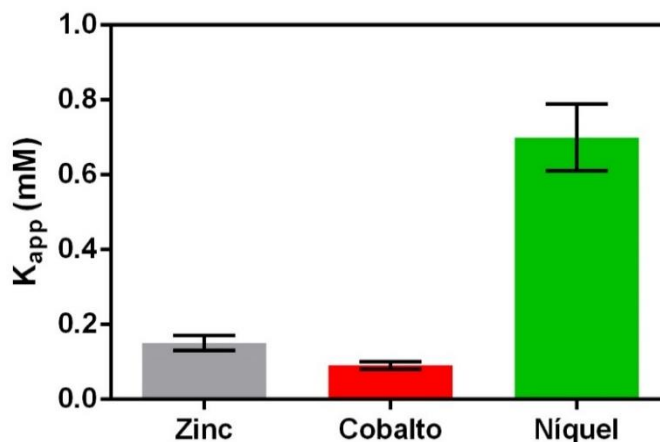
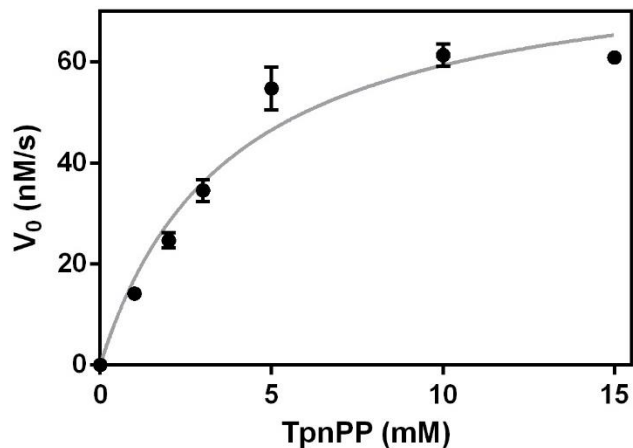


Figura 5.14 Afinidad aparente (K_{app}) de la RNasa Z por los iones metálicos estudiados

5.3.2. Actividad nativa fosfodiesterasa con diferentes metales

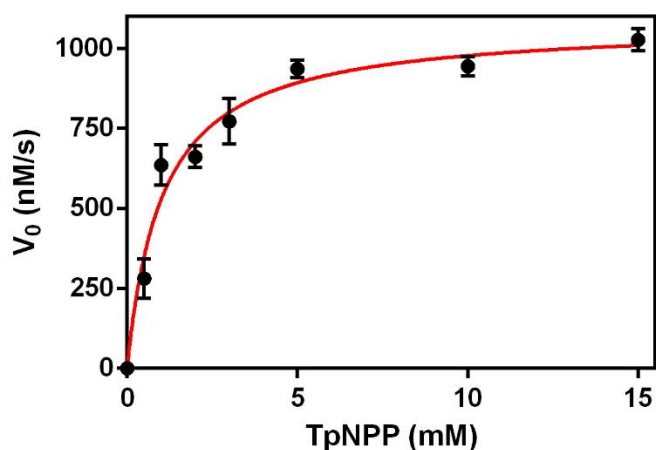
El estudio de la actividad nativa de fosfodiesterasa de la RNasa Z sobre timidin-5'-*p*-nitrofenil fosfato (TpNPP), un análogo del sustrato fisiológico, el tRNA, se llevó a cabo mediante ensayos espectrofotométricos continuos a una concentración 50 nM de enzima y la concentración ideal del metal correspondiente, monitoreando la formación de *p*-nitrofenol (pNP). Los valores de velocidad inicial y su ajuste al modelo de Michaelis-Menten se muestran en las Figuras Figura 5.15 a Figura 5.17



V_{max}	$81.80 \pm 4.67 \text{ nM/s}$
k_{cat}	$1.64 \pm 0.09 \text{ s}^{-1}$
K_m	$3.79 \pm 0.57 \text{ mM}$
k_{cat}/K_m	$(4.33 \pm 0.69) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R^2	0,9617

Tris-HCl 200 mM, pH 7.4, 25 °C
RNasa Z 50 nM, ZnCl₂ 1 mM

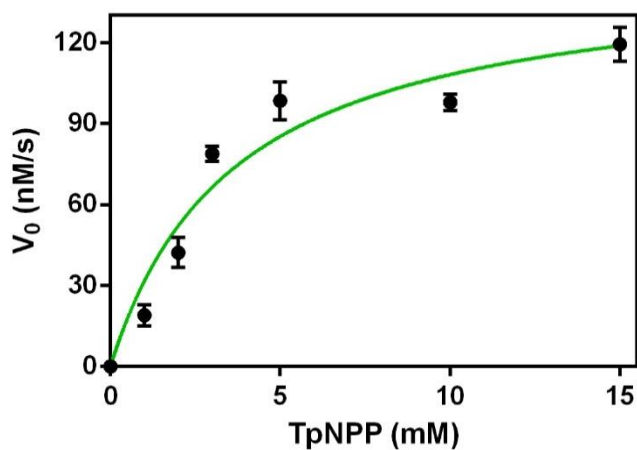
Figura 5.15 Actividad nativa de la enzima incubada con zinc.



V_{max}	$1080 \pm 34 \text{ nM/s}$
k_{cat}	$21.60 \pm 0.68 \text{ s}^{-1}$
K_m	$1.05 \pm 0.13 \text{ mM}$
k_{cat}/K_m	$(20.57 \pm 2.63) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R^2	0,9620

Tris-HCl 200 mM, pH 7.4, 25 °C
RNasa Z 50 nM, CoSO₄ 2 mM

Figura 5.16 Actividad nativa de la enzima incubada con cobalto.



V_{max}	$147.80 \pm 11.03 \text{ nM/s}$
k_{cat}	$2.96 \pm 0.22 \text{ s}^{-1}$
K_m	$3.68 \pm 0.73 \text{ mM}$
k_{cat}/K_m	$(8.04 \pm 1.70) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
R^2	0,9357

Tris-HCl 200 mM, pH 7.4, 25 °C
RNasa Z 50 nM, NiCl₂ 10 mM

Figura 5.17 Actividad nativa de la enzima incubada con níquel.

Al comparar los valores de k_{cat} es posible observar que la enzima incubada con cobalto alcanza un valor 13 veces mayor a aquella incubada con zinc, mientras tanto, la enzima con níquel alcanza un valor aproximadamente del doble que el de aquella incubada con zinc.

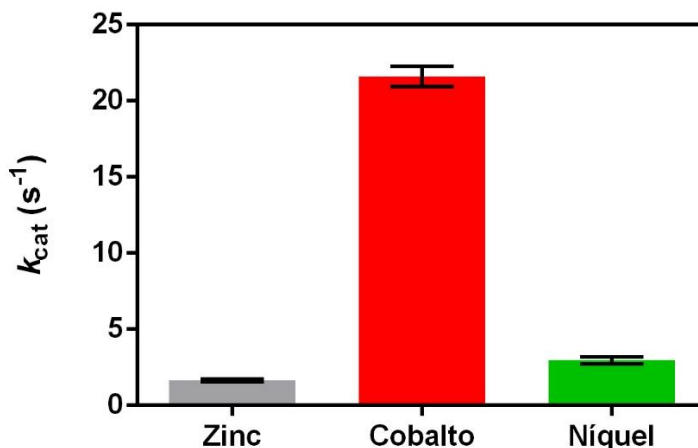


Figura 5.18 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat} para la actividad nativa.

Por otro lado, los valores de K_m para la proteína incubada con zinc y con níquel no presentan diferencias estadísticamente significativas; en cambio la proteína incubada con cobalto presenta una K_m 3.5 veces menor.

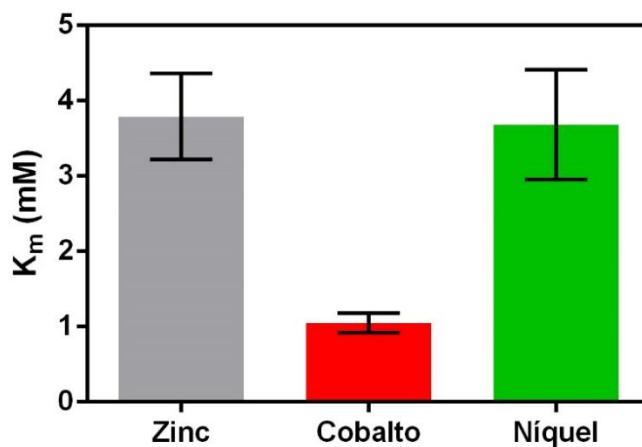


Figura 5.19 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la K_m para la actividad nativa.

Finalmente, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) es considerablemente mayor (≈ 50 veces respecto a la enzima incubada con zinc) para la enzima incubada con cobalto, lo cual es resultado

de una mayor k_{cat} y una menor K_m . Además, la enzima incubada con níquel alcanza una eficiencia catalítica dos veces mayor a la enzima incubada con zinc, dado que su valor de k_{cat} es aproximadamente el doble, mientras la K_m no presenta diferencias significativas.

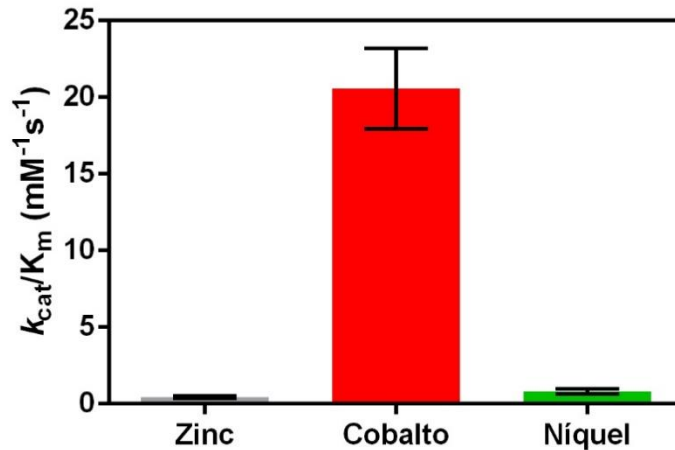
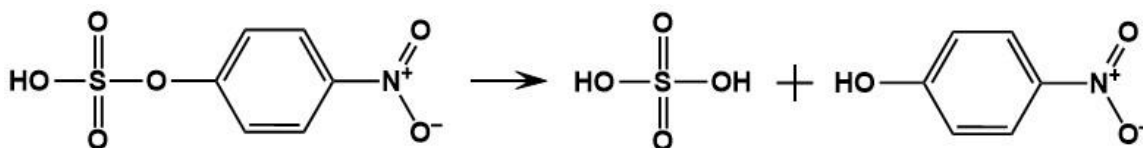


Figura 5.20 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat}/K_m para la actividad nativa.

5.3.3. Actividad promiscua fosfonatasa y monofosfatasa con diferentes metales

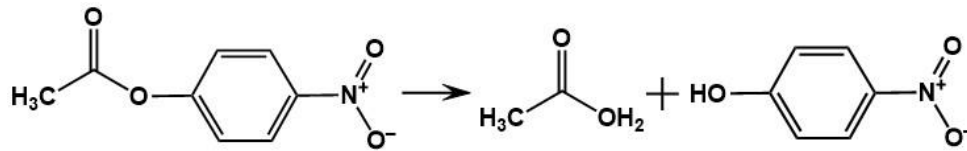
Para determinar la presencia de actividades promiscuas en la RNasa Z, se efectuaron ensayos enzimáticos de punto final sobre sustratos fisiológicos de otros miembros de la familia estructural de las metalo- β -lactamasas (según la clasificación de Daiyasu *et. al*) [22]. A continuación, se muestran los resultados de los experimentos después de incubar a la enzima y los sustratos correspondientes a 25 °C durante toda la noche, la estructura de los sustratos utilizados y el sitio donde se llevaría a cabo la hidrólisis enzimática.



Blanco Zinc Cobalto Níquel



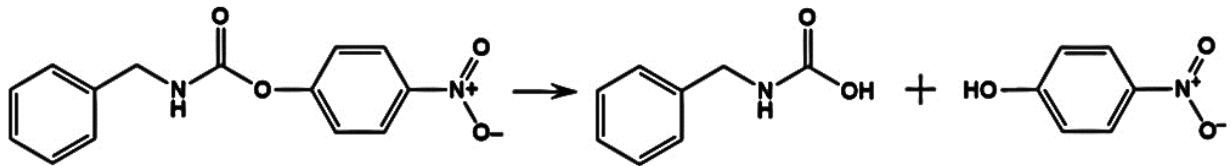
Figura 5.21 Ensayo para detectar actividad promiscua de sulfatasa de la RNasa Z sobre p -nitrofenil sulfato (pNPS).



Blanco Zinc Cobalto Níquel



Figura 5.22 Ensayo para detectar actividad promiscua de acetato hidrolasa de la RNasa Z sobre p-nitrofenil acetato (pNPA).



Blanco Zinc Cobalto Níquel

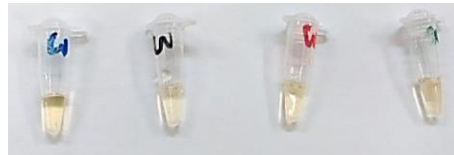
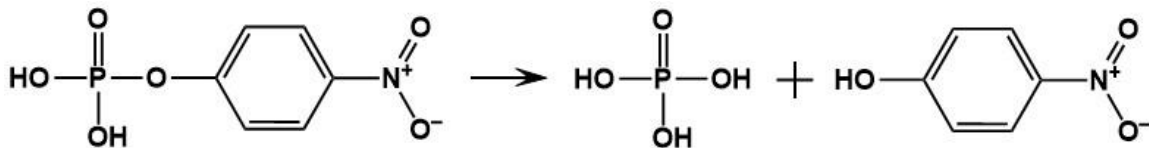


Figura 5.23 Ensayo para detectar actividad promiscua de carbamato hidrolasa de la RNasa Z sobre p-nitrofenil N-bencilcarbamato (pNPC).



Blanco Zinc Cobalto Níquel



Figura 5.24 Ensayo para detectar actividad promiscua de monofosfatasa de la RNasa Z sobre p-nitrofenil fosfato (pNPP).

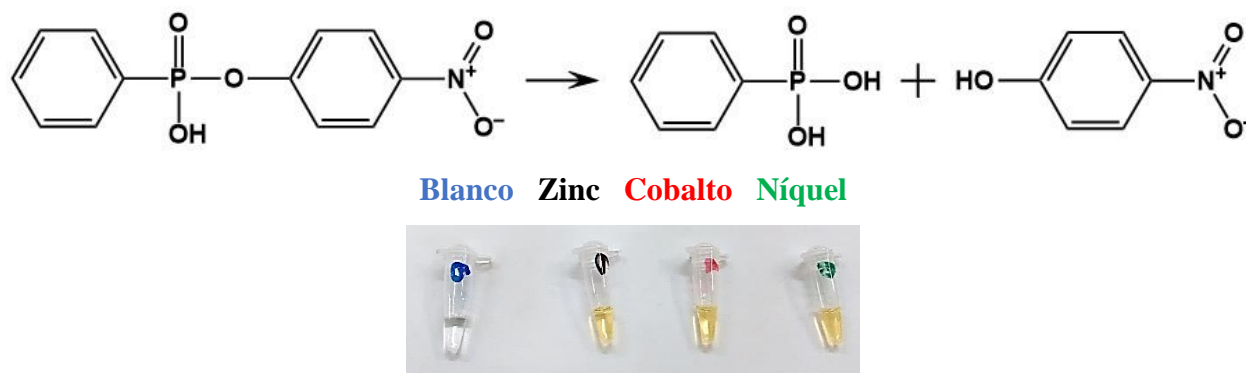
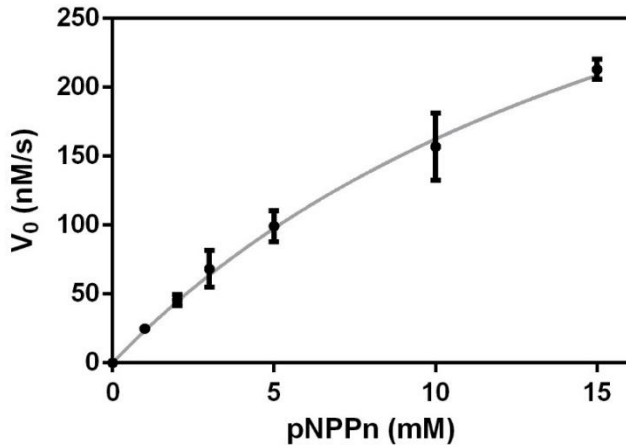


Figura 5.25 Ensayo para detectar actividad promiscua de fosfonatasa de la RNasa Z sobre *p*-nitrofenil fenilfosfonato (pNPPPn).

No fue posible detectar actividad promiscua de sulfatasa, lo que se pone de manifiesto en la ausencia de coloración amarilla en el ensayo correspondiente (Figura 5.21). En el caso de las actividades promiscuas de acetato hidrolasa y carbamato hidrolasa (Figura 5.22 y Figura 5.23), los ensayos no permitieron discernir entre el blanco y los experimentos con enzima, debido a que el sustrato se hidroliza en el Buffer de Ensayo. Solamente en los ensayos para detectar las actividades promiscuas de fosfonatasa y de monofosfatasa (Figura 5.24 y Figura 5.25) fue posible observar una coloración amarilla en las reacciones con enzima, pero no en los blancos, poniendo de manifiesto que la RNasa Z posee dichas actividades promiscuas. Con base en los resultados obtenidos se procedió a la caracterización cinética de la actividad promiscua de fosfonatasa sobre *p*-nitrofenil fenilfosfonato (pNPPPn) y la actividad promiscua de monofosfatasa sobre *p*-nitrofenil fosfato (pNPP), mediante ensayos espectrofotométricos continuos, monitoreando la formación de *p*-nitrofenol (pNP), siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3.3.

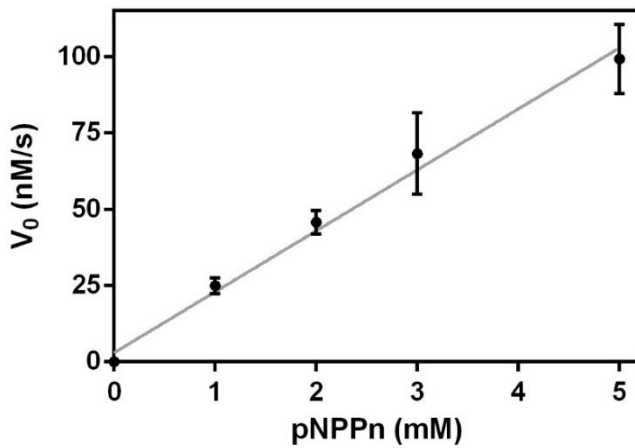
En el caso de la actividad promiscua de fosfonatasa, los resultados del análisis mediante la ecuación de Michaelis-Menten indicaron que la K_m para la reacción es superior a las concentraciones de sustrato utilizadas en los ensayos (Figura 5.26), por lo que se procedió al análisis lineal de los primeros datos de velocidad inicial (hasta 5 mM) con el fin de obtener la k_{cat}/K_m a partir de la pendiente de dicha gráfica (Figura 5.27). Al dividir la pendiente ($19.98 \pm 0.92 \text{ nM s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) entre la concentración de enzima en el ensayo (500 nM) se obtiene un valor de $k_{cat}/K_m = 39.9 \pm 1.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, el cual es 22.8 % menor al obtenido a partir de los datos del ajuste al modelo de Michaelis-Menten ($k_{cat}/K_m = 48.97 \pm 12.78 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), aunque se encuentra dentro del intervalo de error.



V_{\max}	$484.40 \pm 68.87 \text{ nM/s}$
k_{cat}	$0.97 \pm 0.14 \text{ s}^{-1}$
K_m	$19.81 \pm 4.31 \text{ mM}$
k_{cat}/K_m	$(4.90 \pm 1.28) \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
R^2	0,9743

Tris-HCl 200 mM, pH 7.4, 25 °C
RNasa Z 100 nM, ZnCl₂ 1 mM

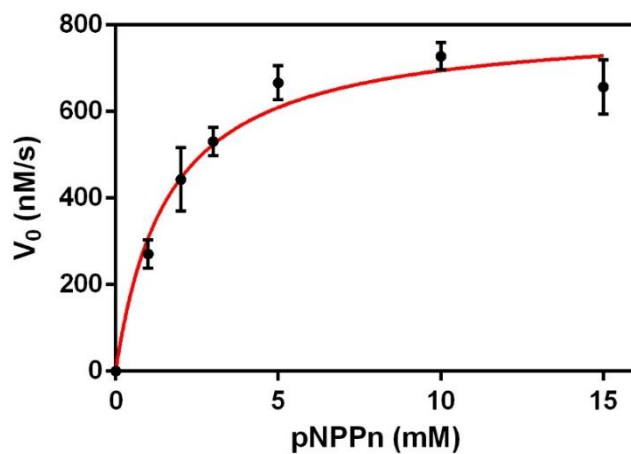
Figura 5.26 Actividad promiscua de fosfonatasa de la enzima con zinc.



Ecuación	$y = 19.98x + 2.970$
Pendiente	19.98 ± 0.9180
R^2	0.9634
k_{cat}/K_m	$(3.99 \pm 0.18) \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Tris-HCl 200 mM, pH 7.4, 25 °C
RNasa Z 100 nM, ZnCl₂ 1 mM

Figura 5.27 Actividad promiscua de fosfonatasa de la enzima con zinc (análisis lineal)



V_{\max}	$807.50 \pm 26.20 \text{ nM/s}$
k_{cat}	$1.62 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$
K_m	$1.63 \pm 0.19 \text{ mM}$
k_{cat}/K_m	$(9.94 \pm 1.20) \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
R^2	0,9521

Tris-HCl 200 mM, pH 7.4, 25 °C
RNasa Z 100 nM, CoSO₄ 2 mM

Figura 5.28 Actividad promiscua de fosfonatasa de la enzima con cobalto.

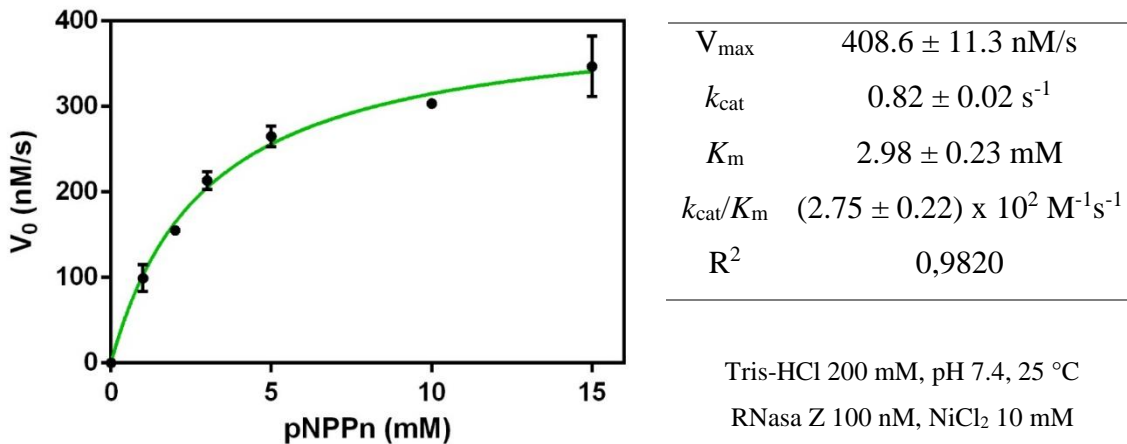


Figura 5.29 Actividad promiscua de fosfonatasa de la enzima con níquel.

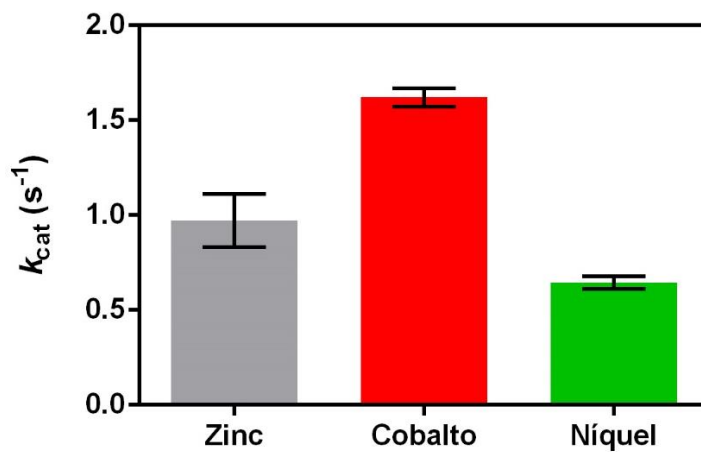


Figura 5.30 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat} para la actividad promiscua de fosfonatasa.

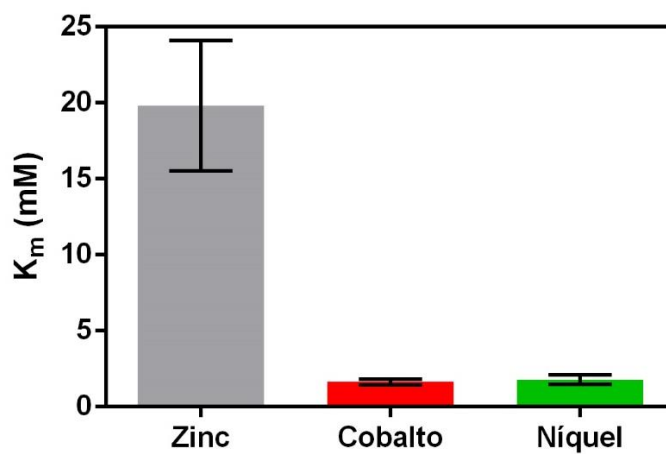


Figura 5.31 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la K_m para la actividad promiscua de fosfonatasa.

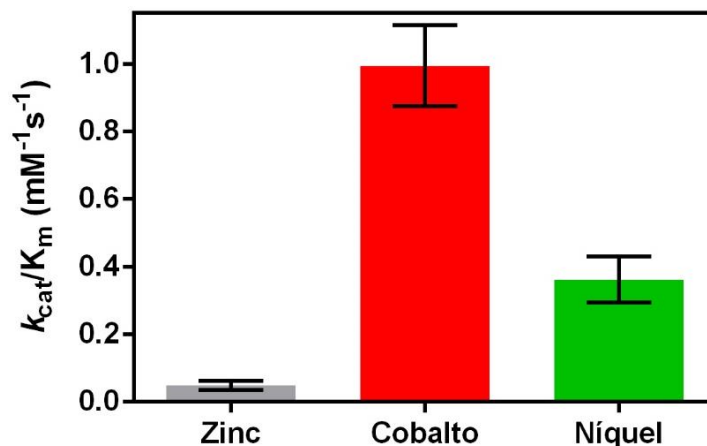


Figura 5.32 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat}/K_m para la actividad promiscua de fosfonatasa.

De manera similar, el análisis de la actividad promiscua de monofosfatasa mediante la ecuación de Michaelis-Menten (Figura 5.33) indica que la K_m es prácticamente igual a la máxima concentración de sustrato utilizada en los ensayos, por lo cual se procedió al análisis lineal de los primeros datos de velocidad inicial (hasta 15 mM) con el fin de obtener la k_{cat}/K_m a partir de la pendiente de dicha gráfica (Figura 5.34). Al dividir la pendiente ($0.7868 \pm 0.0578 \text{ nM s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) entre la concentración de enzima en el ensayo (1500 nM) se obtiene un valor de $k_{cat}/K_m = 0.52 \pm 0.03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, el cual es 32.7 % menor al obtenido a partir de los datos del ajuste al modelo de Michaelis-Menten ($k_{cat}/K_m = 0.69 \pm 0.31 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$), aunque es pertinente considerar que dicho valor posee un error experimental bastante amplio debido al error asociado a la K_m .

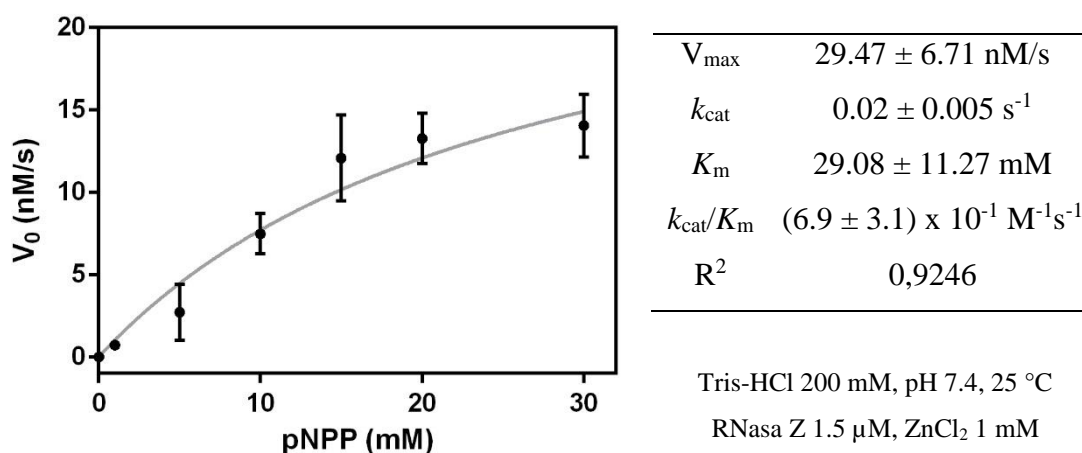


Figura 5.33 Actividad promiscua de monofosfatasa de la enzima con zinc.

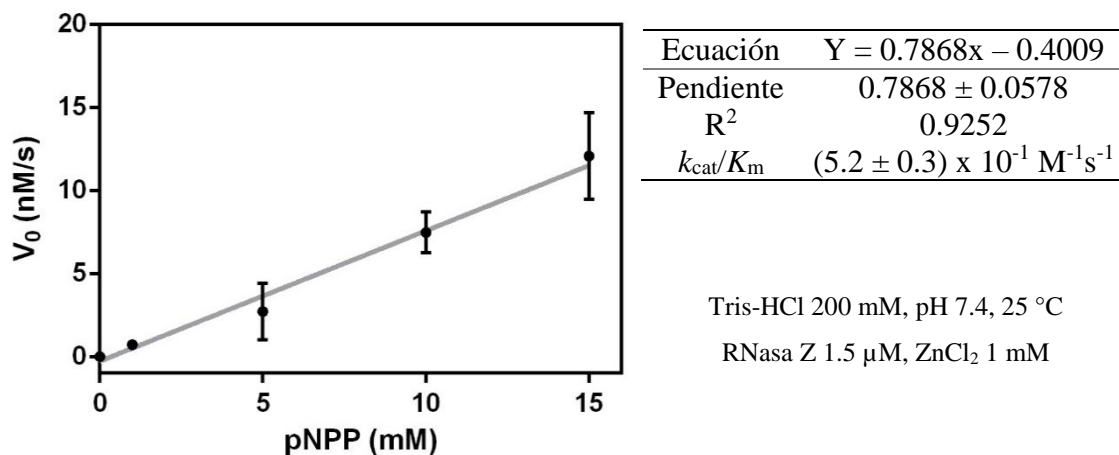


Figura 5.34 Actividad promiscua de monofosfatasa de la enzima con zinc (análisis lineal).

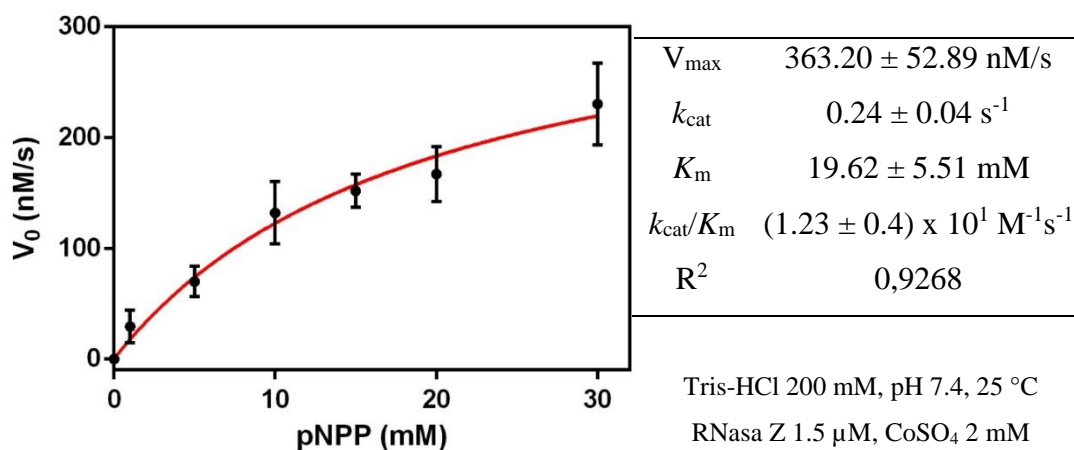


Figura 5.35 Actividad promiscua de monofosfatasa de la enzima con cobalto.

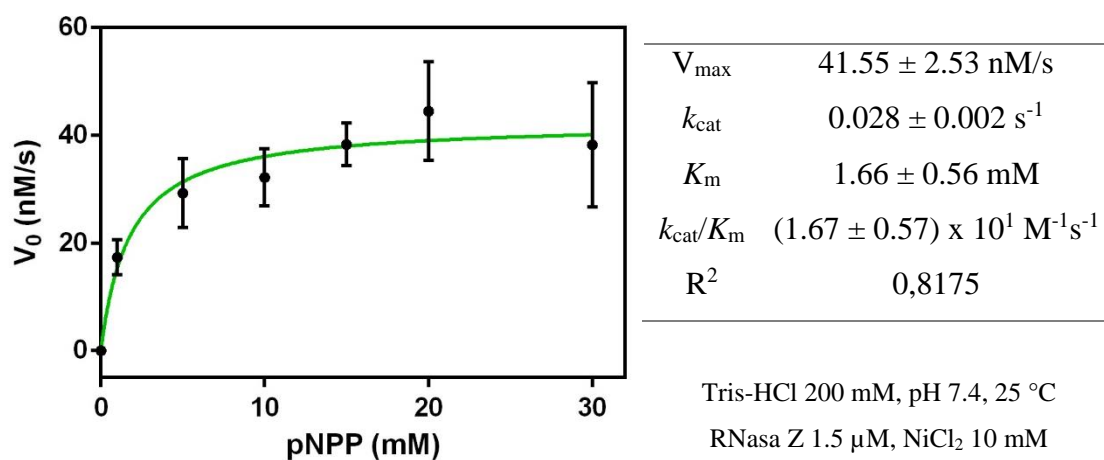


Figura 5.36 Actividad promiscua de monofosfatasa de la enzima con níquel.

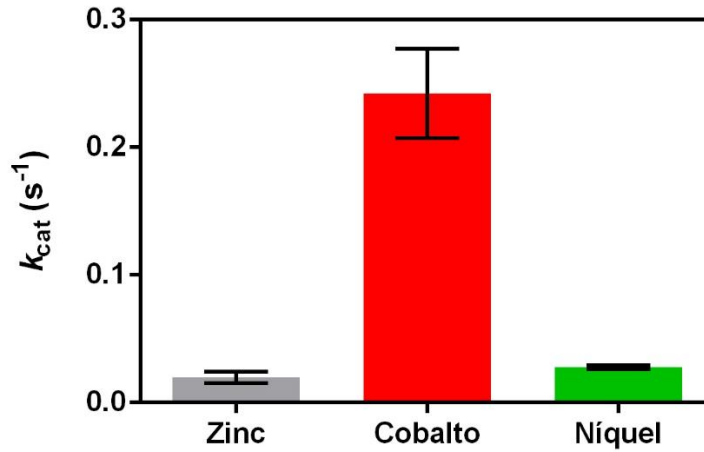


Figura 5.37 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat} para la actividad promiscua de monofosfataza.

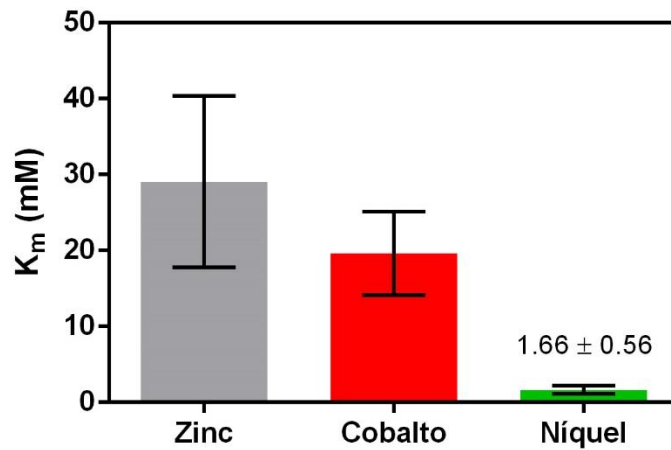


Figura 5.38 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la K_m para la actividad promiscua de monofosfataza.

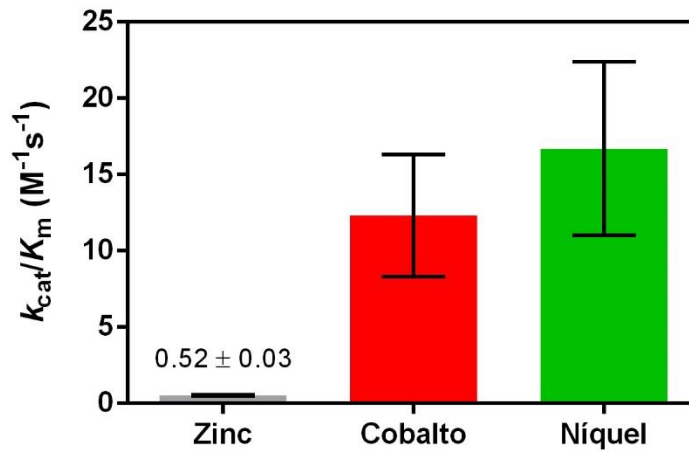


Figura 5.39 Efecto del intercambio de los iones metálicos del sitio activo sobre la k_{cat}/K_m para la actividad promiscua monofosfataza.

Tabla 5.2 Resumen de las constantes cinéticas encontradas.

Actividad	Zinc			Cobalto			Níquel		
	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m
Fosfodiesterasa	1.64	3.79	4.33×10^2	21.6	1.05	2.06×10^4	2.96	3.68	8.04×10^2
Fosfonatasa	0.97	19.81	4.90×10^1	1.62	1.63	9.94×10^2	0.82	2.98	2.75×10^2
Monofosfatasa	0.02	29.08	6.9×10^{-1}	0.24	19.62	1.23×10^1	0.028	1.66	1.67×10^1

k_{cat} (s^{-1}), K_m (mM) y k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)

5.4. Discusión

La adición de EDTA provoca la remoción de los iones presentes en el sitio activo al favorecer la formación de complejos EDTA-Metal, dando origen a un sitio activo “vacío” que pueden ser ocupado por el metal agregado en cada experimento, por lo que, al incubar a la apoenzima con zinc, cobalto o níquel, se recupera la actividad enzimática. Los valores de la K_{app} sugieren que la afinidad de la RNasa Z por los iones metálicos se comporta de la siguiente manera $Co^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+}$, sin embargo, debido a que la proteína posee una HisTag, es probable que dichos valores sean mayores a los que se hubiesen obtenido para la proteína silvestre, ya que la cola de histidinas es capaz de complejar estos iones metálicos [23].

En general, la mayor actividad se presenta con la enzima sustituida con cobalto, seguida de la enzima sustituida con zinc y finalmente la enzima sustituida con níquel. El cobre recupera la actividad enzimática nativa de fosfodiesterasa de manera incipiente y está no presenta una tendencia clara.

Los miembros de la familia de las MBL utilizan metales para llevar a cabo diversos tipos de reacciones, las hidrolasas de dicha superfamilia comparten un mecanismo catalítico similar en el cual los iones metálicos, junto con los residuos del sitio catalítico, posicionan el sustrato en la orientación adecuada y actúan como ácidos de Lewis activando una molécula de agua vecina que lleva a cabo el ataque nucleofílico.

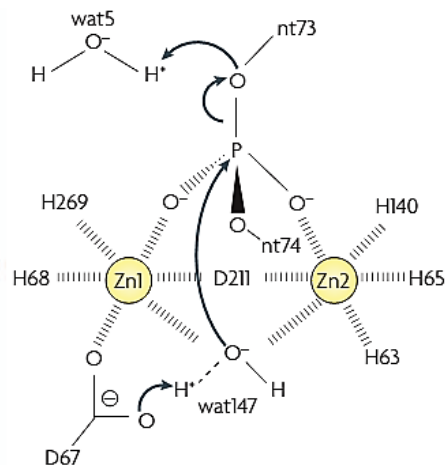


Figura 5.40 Reacción catalizada por la RNasa Z, un ejemplo del mecanismo propuesto para las hidrolasas de la familia de las metalo- β -lactamasas.

(Redko, de la Sierra-Gallay y Condon, 2007) [15].

Los metales poseen características físicas y químicas particulares (carga, radio iónico, geometría de coordinación, dureza, energía de ionización, etc.) que pueden influir en su papel como cofactores enzimáticos, alterando la conformación del sitio activo, la posición del sustrato o moléculas de agua vecinas y, por lo tanto, la actividad enzimática. Algunas de las características de los iones metálicos utilizados se presentan en la Tabla 5.3 (Andreini et al., 2008)[24].

Tabla 5.3 Características de los iones metálicos utilizados

Metal	Estado de oxidación	Radio iónico (Å)	Configuración electrónica	Numero de coordinación	Geometría de coordinación	Dureza (Lewis)	I_p (eV)
Zn	+2	0.74	[AR]3d ¹⁰	4	Tetraédrica	Intermedia	17.96
				6	Octaédrica		
Co	+2	0.75	[AR]3d ⁷	4	Tetraédrica	Intermedia	17.06
				6	Octaédrica		
Ni	+2	0.69	[AR]3d ⁸	4	Tetraédrica	Intermedia	18.16
				6	Octaédrica		
Cu	+2	0.73	[AR]3d ⁹	4	Tetraédrica	Intermedia	20.29
				6	Octaédrica		

Todos los iones metálicos utilizados en este trabajo se encuentran en un estado de oxidación +2 y no difieren significativamente en sus radios iónicos, por lo que las diferencias observadas en las constantes cinéticas de las reacciones nativa y promiscuas deben ser causadas por otros factores, por ejemplo:

- La capacidad de cada ión para actuar como ácido de Lewis, es decir, ser un aceptor de electrones. Aunque en general el zinc, cobalto, níquel y cobre se clasifican como ácidos de Lewis de dureza intermedia, el valor de la energía del potencial de ionización I_p (de M a M^{2+}) puede considerarse como una medida del carácter ácido del ión M^{2+} , ya que está relacionado con la afinidad electrónica del proceso inverso (M^{2+} a M) y, por tanto, con la capacidad para desplazar densidad electrónica.
- La geometría de coordinación. El número de coordinación para los iones metálicos del sitio activo es de 6 (Figura 5.40), en este caso la geometría de coordinación mostrada por el zinc, cobalto, níquel y cobre es octaédrica. Sin embargo, se ha reportado que un reacomodo en la forma en la que se coordina el ion metálico puede alterar la actividad enzimática [25], además, la geometría de coordinación predominante en otras enzimas difiere considerablemente, mientras que el zinc forma casi exclusivamente complejos con geometría tetraédrica, el cobalto y el níquel forman complejos con geometría octaédrica, y el cobre presenta una geometría cuadrada planar en sus complejos [26].

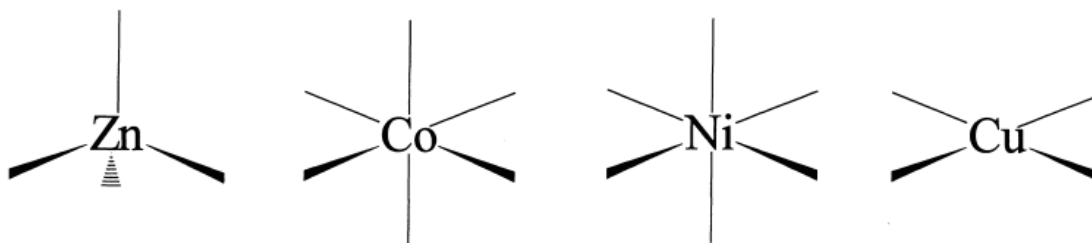


Figura 5.41 Geometría de coordinación predominante para los cationes divalentes utilizados.

(Republic, 1998) [26].

- La estabilidad de los complejos metálicos formados difiere considerablemente de acuerdo a la escala de Irving-Williams, siguiendo una tendencia sobresaliente: el ion metálico que confiere la menor actividad, el cobre, es aquel que forma complejos más estables, mientras que el ion metálico que confiere la mayor actividad, el cobalto, forma los complejos menos estables. Sin embargo, los iones de níquel y zinc, forman complejos con una estabilidad

similar, pero la actividad enzimática que confieren a la enzima difiere considerablemente [27,28]. En este escenario podemos considerar que la estabilidad (o inestabilidad) de los complejos que forman los iones metálicos puede estar relacionada con la capacidad que estos poseen para proveer un ambiente favorable para la transferencia de densidad electrónica, necesaria para activar la molécula de agua que da origen al ion hidroxilo que genera el ataque nucleofílico, o bien, favorecen ciertos cambios conformacionales que pueden ocurrir durante la catálisis.

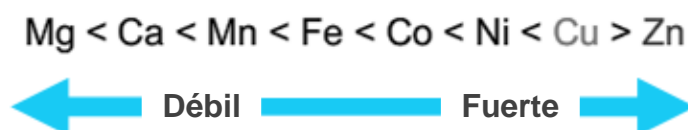


Figura 5.42 Estabilidad de los complejos de cationes divalentes según las series de Irving-Williams.

(Irving y Williams, 1948) [27]. (Foster y Robinson, 2011) [28]

Las reacciones promiscuas encontradas proceden a través de la ruptura de un enlace P-O, pero difieren en la estructura de los sustratos y las cargas o sustituyentes que estos poseen. El hecho de que una nueva actividad enzimática pueda emerger o mejorarse a través de la unión de un nuevo ion metálico en el sitio activo representa una ventaja evolutiva, ya que se trata de un procedimiento rápido que no involucra la modificación de la estructura enzimática o la secuencia de DNA. También debe considerarse como una característica favorable la presencia de un sitio activo suficientemente expuesto para permitir la entrada a sustratos de estructura y volumen diverso, situación que se presenta en la RNasa Z. El papel que juegan los centros metálicos en las diversas reacciones estudiadas, el tamaño, posicionamiento y carácter ácido/básico de los residuos del sitio activo pueden dar origen a las diferencias observadas en la actividad para los sustratos analizados. En el caso de la enzima incubada con zinc, cobalto y níquel se presenta actividad promiscua de fosfonatasa y monofosfatasa, no se observa actividad de sulfatasa, mientras que no es posible discriminar la existencia de actividad de carbamato hidrolasa y de acetato hidrolasa ya que no hay diferencia clara con el blanco durante el tiempo de ensayo.

Fosfonatasa

En el caso de la actividad promiscua de fosfonatasa, los valores de k_{cat} y K_m obtenidos para la RNasa Z incubada con zinc, cobalto y níquel se encuentran en el rango de aquellos reportados en la base de datos para enzimas BRENDA para la actividad promiscua sobre pNPPPn de las enzimas: aminopeptidase S (3.4.11.24) de *Streptomyces sp.* [29], fosfodiesterasa 1 (3.1.4.1) de *Rhizobium leguminosarum* [30], glicerosfosfocolina fosfodiesterasa (3.1.4.2) de *Enterobacter aerogenes* [31] y polinucleótido quinasa/fosfatasa o PNKP (3.1.3.32) de *Clostridium thermocellum* [32].

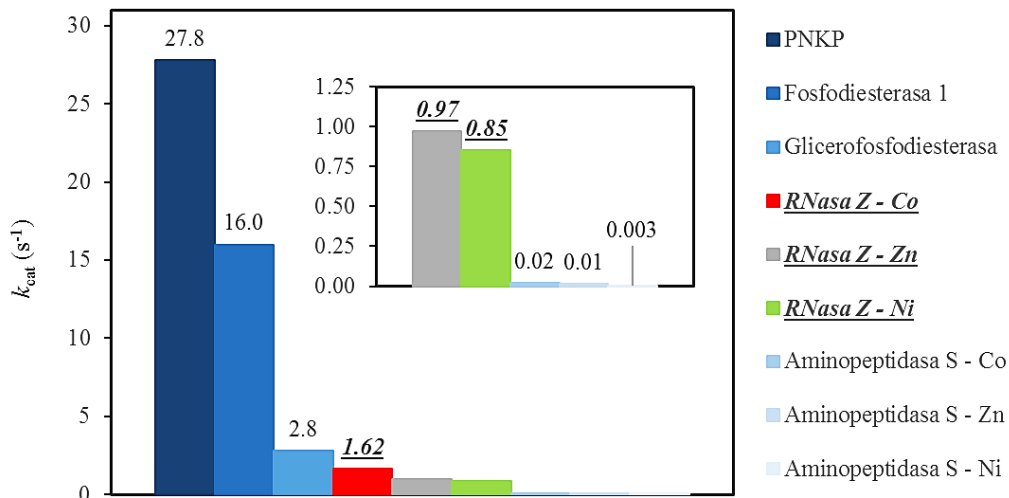


Figura 5.43 Valores de k_{cat} reportados para la actividad promiscua de fosfonatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPPPn.

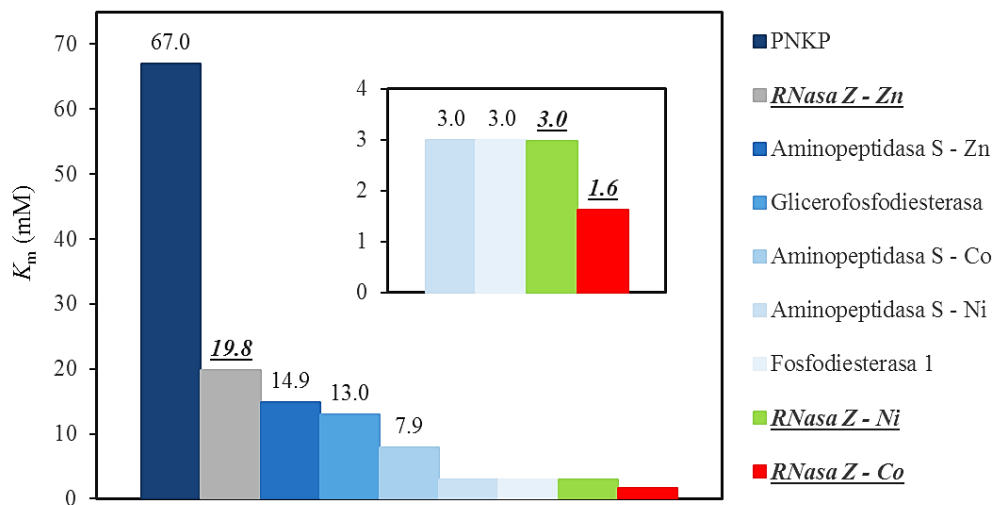


Figura 5.44 Valores de K_m reportados para la actividad promiscua de fosfonatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPPPn.

La eficiencia catalítica de la RNasa Z incubada con cobalto es 2.4 veces mayor al que presenta la polinucleótido 3' fosfatasa, seguida por la enzima incubada con níquel, que supera ligeramente a la glicerofosfocolina fosfodiesterasa, finalmente la enzima incubada con zinc presenta un valor 7.5 veces mayor al reportado para la fosfodiesterasa 1 y más de 10 veces mayor al reportado para la aminopeptidase S incubada con zinc, cobalto o níquel.

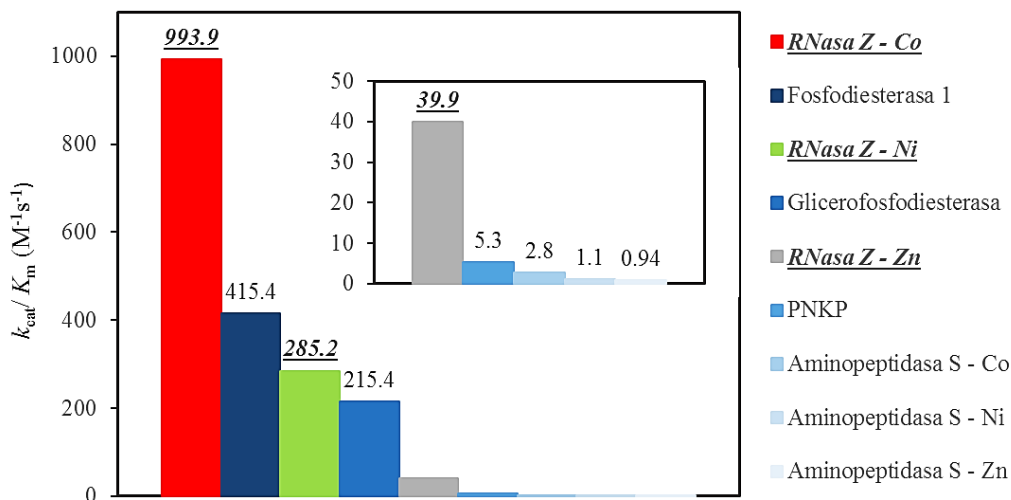


Figura 5.45 Valores de k_{cat}/K_m reportados para la actividad promiscua de fosfonatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPPPn.

Las eficiencias catalíticas de las reacciones promiscuas analizadas se encuentran en el rango de 10^0 y $10^3 M^{-1}s^{-1}$, con la RNasa Z sustituida con cobalto siendo la más eficiente. La mayoría de dichas enzimas son fosfodiesterasas o monofosfatasa de manera nativa, mientras que la enzima con la eficiencia catalítica más baja, la aminopeptidasa S, es aquella que posee la actividad nativa que más difiere del resto, llevar a cabo la ruptura de enlaces C-N. La eficiencia catalítica de las reacciones promiscuas analizadas difiere en casi dos órdenes de magnitud respecto a la actividad nativa de la fosfonato monoesterasa de *Escherichia coli*, cuyo valor es de $1.5 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ [33,34].

Fosfatasa

Por otro lado, los valores para k_{cat} y K_m obtenidos para la RNasa Z incubada con zinc, cobalto y níquel se encuentran en el rango de aquellos reportados en BRENDA para la actividad promiscua sobre el sustrato pNPP de las enzimas: 2',3' fosfodiesterasa cíclica (3.1.4.16) de

Escherichia coli [32], fosfonato monoesterasa (3.1.4.1) de *Burkholderia caryophilli* [35] y arilsulfatasa (3.1.6.1) de *Pseudomonas aeruginosa* [12].

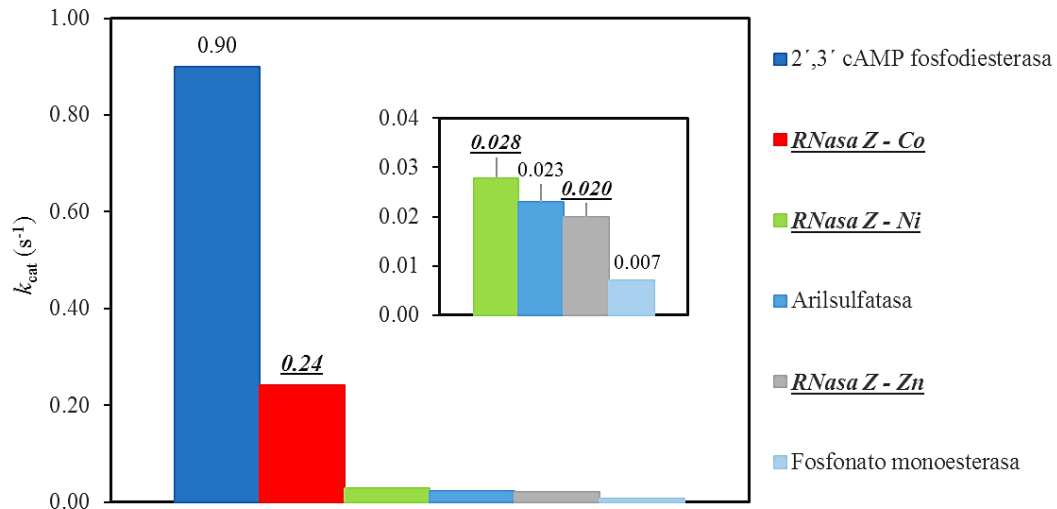


Figura 5.46 Valores de k_{cat} reportados para la actividad de monofosfatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPP.

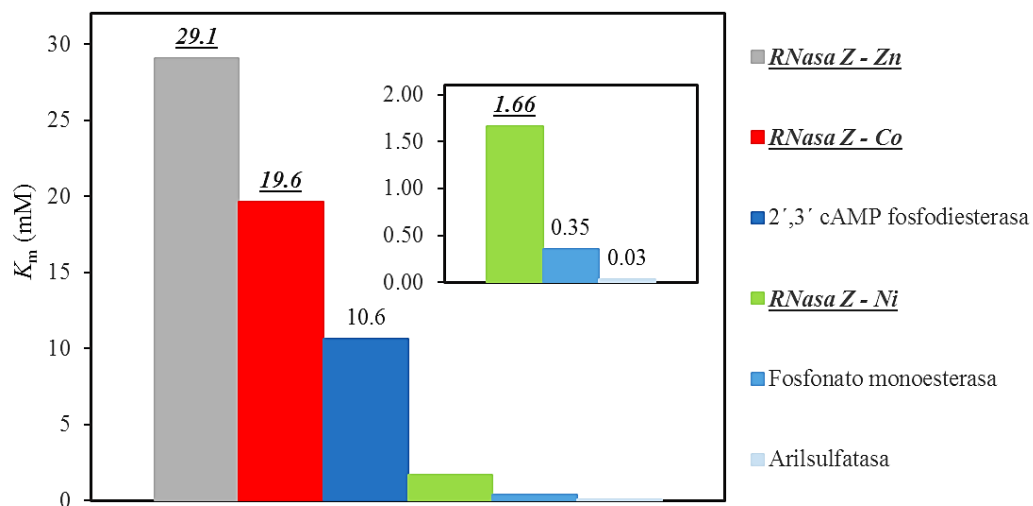


Figura 5.47 Valores de K_m reportados para la actividad de monofosfatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPP.

La eficiencia catalítica de la *RNasa Z* incubada con níquel es 9 veces menor a la reportada para la arilsulfatasa, 5 veces menor a la reportada para la 2',3' fosfodiesterasa de nucleótido cíclico y 31.7 % menor a la fosfonato monoesterasa, la eficiencia catalítica de la enzima incubada con

cobalto es 35 % menor a aquella incubada con níquel, pero 10 % mayor a la arginina fosfata, la cual a su vez es 21.5 veces mayor a la de la enzima incubada con zinc.

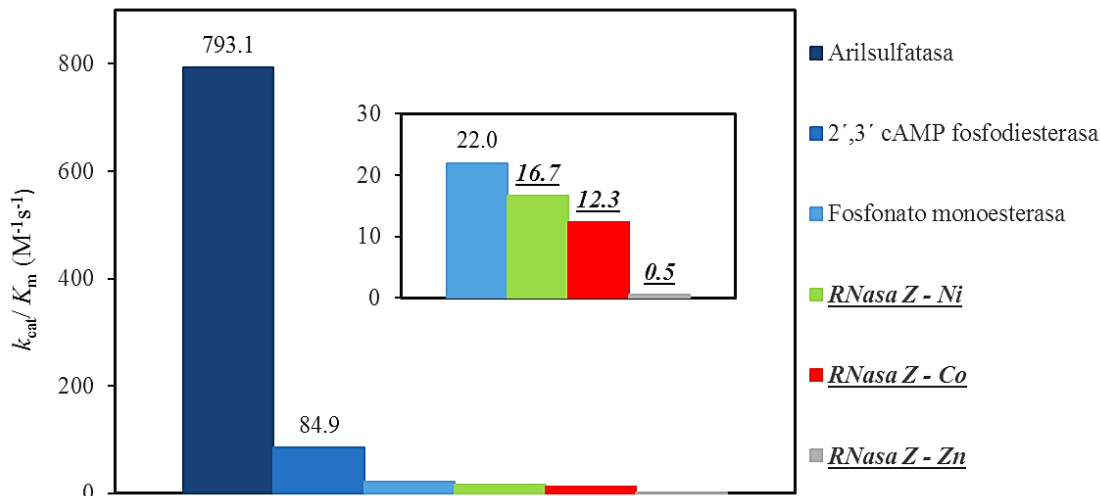


Figura 5.48 Valores de k_{cat}/K_m reportados para la actividad de monofosfatasa de diversas enzimas sobre el sustrato pNPP.

Las eficiencias catalíticas de las reacciones promiscuas analizadas se encuentran en el rango de 10^{-1} a $10^2 M^{-1}s^{-1}$. De manera sobresaliente, la mayor eficiencia catalítica para la actividad de monofosfatasa de la RNasa Z se presenta para la enzima incubada con níquel y no para la enzima incubada con cobalto, como había ocurrido en los experimentos de la actividad nativa de fosfodiesterasa y de la actividad promiscua de fosfonatasa. La eficiencia de las reacciones promiscuas analizadas difiere en dos órdenes de magnitud respecto a la actividad nativa de la fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*, cuyo valor es de $3.80 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$ [33,34].

Durante la realización de este proyecto Baier, Chen, Solomonson, Strynadka y Tokuriki publicaron el artículo “Distinct Metal Isoforms Underlie Promiscuous Activity Profiles of Metalloenzymes” [36], en el cual analizaron el efecto de la sustitución de los iones metálicos del sitio activo en el perfil de actividades catalíticas de cinco enzimas de la familia de las metalo- β -lactamasas, incluyendo a la RNasa Z (rbn) de *E. coli*. A pesar de que se utilizan diferentes metodologías (incluyendo diferentes sustratos), consideramos que es pertinente mencionar los resultados de aquellos experimentos que coinciden con los presentados en esta tesis de grado:

Actividad nativa de fosfodiesterasa

En ambos trabajos, la enzima sustituida con cobalto es la que posee la mayor actividad, seguida por la enzima sustituida con níquel. Sin embargo, Baier et al. reportan que la enzima tratada con agentes quelantes y luego incubada con zinc, tiene en promedio una actividad menor a la apoenzima (Figura 5.49). Por el contrario, nuestros experimentos indican que la apoenzima no posee actividad enzimática y la incubación con zinc le permite recuperar la actividad de fosfodiesterasa (Figura 5.10). Esta situación llama particularmente la atención al considerar que la RNasa Z silvestre contiene iones de zinc en su sitio activo, por lo que cabría esperar que una enzima que ha sido incubada con dicho metal poseería actividad enzimática.

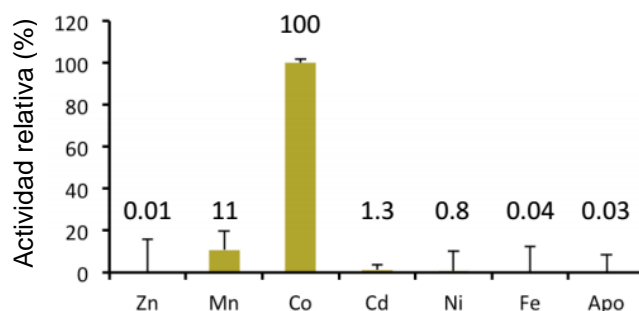


Figura 5.49 Actividad de fosfodiesterasa para la RNasa Z sustituida con diversos metales

La enzima incubada con zinc muestra una actividad menor a la apoenzima (Baier et al., 2015) [36]

Las constantes cinéticas de la actividad de fosfodiesterasa se determinaron con sustratos diferentes: TpNPP en esta tesis y bpNPP (bis- ρ -nitrofenil fosfato) en el trabajo de Baier et al. [36]. Las constantes difieren en un orden de magnitud para la enzima sustituida con zinc y níquel, pero se encuentran en el mismo intervalo para la enzima sustituida con cobalto (Tabla 5.4).

Tabla 5.4 Constantes cinéticas asociadas a la actividad de fosfodiesterasa de la RNasa Z

Sustrato	Zinc			Cobalto			Níquel		
	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m
TpNPP ¹	1.64	3.79	4.33×10^2	21.6	1.05	2.06×10^4	2.96	3.68	8.04×10^2
bpNPP ²	n.d.	>10	1.40×10^1	53.0	0.56	9.40×10^4	1.30	0.39	3.30×10^3

k_{cat} (s^{-1}), K_m (mM) y k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)

¹Esta Tesis. ²(Baier et al., 2015) [36].

Actividad promiscua de sulfatasa

Baier et al. reportan que la enzima sustituida con níquel es capaz de hidrolizar al p-nitrofenil sulfato (pNPS), presentado las siguientes constantes cinéticas:

Tabla 5.5. Constantes cinéticas asociadas a la actividad promiscua de sulfatasa

k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m
$2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$> 10 \text{ Mm}$	$2.6 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

(Baier et al., 2015) [36]

En nuestros experimentos no fue posible detectar la presencia de esta actividad promiscua, dado que utilizamos una concentración de enzima $1.5 \mu\text{M}$, mientras los ensayos propuestos por Baier et al. se llevaron a cabo a una concentración de enzima $10 \mu\text{M}$. Además, los valores de k_{cat} y k_{cat}/K_m reportados para la actividad de sulfatasa son un orden de magnitud menores a los valores más pequeños que determinamos para la k_{cat} de la actividad monofosfatasa de la enzima con níquel ($2.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) y para la k_{cat}/K_m de la actividad monofosfatasa de la enzima con zinc ($5.2 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

6. Resumen de resultados

- A pesar de que los resultados confirmaron la clonación de la RNasa Z en el plásmido pET-22b, generando las construcciones RZWT y RZHT, no fue posible expresar la enzima a partir de los plásmidos recombinantes obtenidos. Por lo anterior, la RNasa Z se expresó en células de *E. coli* C41 (DE3) utilizando el vector pOH1 [19].
- El tratamiento de la enzima con EDTA permite remover los iones metálicos del sitio activo, observándose una pérdida de la actividad enzimática, misma que se recupera al incubar a la apoenzima en presencia de zinc, cobalto o níquel, sin embargo, la incubación en presencia de cobre no permite recuperar la actividad enzimática.
- La afinidad de la RNasa Z por los iones metálicos estudiados aumenta en el siguiente orden: Ni^{2+} ($K_{\text{app}} = 740 \mu\text{M}$) < Zn^{2+} ($K_{\text{app}} = 170 \mu\text{M}$) < Co^{2+} ($K_{\text{app}} = 90 \mu\text{M}$), sin embargo, los valores de K_{app} (constante aparente) no son concluyentes debido a la presencia del HisTag en la enzima utilizada.
- La enzima presenta actividad promiscua de monofosfatasa y fosfonatasa. No fue posible detectar actividad promiscua de sulfatasa, acetato hidrolasa o carbamato hidrolasa.
- La k_{cat} para las reacciones catalizadas por la RNasa Z incubada con diferentes iones metálicos aumenta en el siguiente orden: Zn^{2+} (1.64 s^{-1}) < Ni^{2+} (2.96 s^{-1}) << Co^{2+} (21.6 s^{-1}) para la actividad nativa, Ni^{2+} (0.82 s^{-1}) < Zn^{2+} (0.97 s^{-1}) < Co^{2+} (1.62 s^{-1}) para la actividad promiscua de fosfonatasa y Zn^{2+} (0.020 s^{-1}) < Ni^{2+} (0.028 s^{-1}) << Co^{2+} (0.24 s^{-1}) para la actividad promiscua de monofosfatasa.
- La K_{m} para las reacciones catalizadas por la RNasa Z incubada con diferentes iones metálicos aumenta en el siguiente orden: Co^{2+} (1.05 mM) < Ni^{2+} (3.68 mM) \approx Zn^{2+} (3.79 mM) para la actividad nativa, Co^{2+} (1.63 mM) < Ni^{2+} (2.98 mM) < Zn^{2+} para la actividad

promiscua de fosfonatasa y Ni^{2+} (1.66 mM) \ll Zn^{2+} (19.62 mM) $<$ Co^{2+} (29.08 mM) para la actividad promiscua de monofosfatasa.

- La k_{cat}/K_m para las reacciones catalizadas por la RNasa Z incubada con diferentes iones metálicos aumenta en el siguiente orden: Zn^{2+} ($4.33 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) $<$ Ni^{2+} ($8.04 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) \ll Co^{2+} ($20.57 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para la actividad nativa, Zn^{2+} ($4.9 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) \ll Ni^{2+} ($2.75 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) $<$ Co^{2+} ($9.93 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para la actividad promiscua de fosfonatasa y Zn^{2+} ($6.9 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) \ll Co^{2+} ($1.2 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) $<$ Ni^{2+} ($1.7 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para la actividad promiscua de monofosfatasa.

7. Conclusiones

- Debido a que todos los iones metálicos utilizados en este trabajo para modificar la actividad de la RNasa Z poseen una carga de $2+$ y no difieren significativamente en sus radios iónicos, estas características no pueden explicar las diferencias observadas en las constantes cinéticas de la reacción nativa y las reacciones promiscuas.
- Por el contrario, los iones metálicos utilizados difieren en su capacidad para actuar como ácidos de Lewis, en la geometría de coordinación que pueden adoptar y en la estabilidad de los complejos que forman, y son estas características las que pueden explicar las diferencias observadas en las constantes cinéticas de la reacción nativa y las reacciones promiscuas.

8. Bibliografía

1. Waldron KJ, Robinson NJ. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(1):25–35.
2. Andreini C, Bertini I, Rosato A. A hint to search for metalloproteins in gene banks. *Bioinformatics.* 2004 Jun 12;20(9):1373–80.
3. Ferrer M, Golyshina O V, Beloqui A, Golyshin PN, Timmis KN. The cellular machinery of *Ferroplasma acidiphilum* is iron-protein-dominated. *Nature.* 2007 Jan 4;445(7123):91–4.
4. Dudev T, Lim C. Competition among Metal Ions for Protein Binding Sites: Determinants of Metal Ion Selectivity in Proteins. *Chem Rev. American Chemical Society;* 2014 Jan 8;114(1):538–56.
5. Foster AW, Osman D, Robinson NJ. Metal preferences and metallation. *J Biol Chem.* 2014;289(41):28095–103.
6. Miraula M, Schenk G, Mitić N. Promiscuous metallo- β -lactamases: MIM-1 and MIM-2 may play an essential role in quorum sensing networks. *J Inorg Biochem.* 2015 Dec;35–7.
7. Okrasa K, Kazlauskas RJ. Manganese-substituted carbonic anhydrase as a new peroxidase. *Chem - A Eur J.* 2006;12(6):1587–96.
8. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, Christiansen G, Moreno-Román P, Gutiérrez AH, et al. Role of metal ions on the activity of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(1):153–61.
9. Sánchez-Moreno I, Iturrate L, Martín-Hoyos R, Jimeno ML, Mena M, Bastida A, et al. From kinase to cyclase: An unusual example of catalytic promiscuity modulated by metal switching. *ChemBioChem.* 2009;10(2):225–9.
10. Khersonsky O, Roodveldt C, Tawfik D. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr Opin Chem Biol.* 2006 Oct;10(5):498–508.
11. Khersonsky O, Tawfik DS. Enzyme Promiscuity – Evolutionary and Mechanistic Aspects. In: *Comprehensive Natural Products II.* Elsevier; 2010. p. 47–88.
12. Olguin LF, Askew SE, O'Donoghue AC, Hollfelder F. Efficient catalytic promiscuity in an enzyme superfamily: an arylsulfatase shows a rate acceleration of 10(13) for phosphate monoester hydrolysis. *J Am Chem Soc. American Chemical Society;* 2008 Dec 10;130(49):16547–55.
13. Lodish H, Berk A ZS et al. The Three Roles of RNA in Protein Synthesis. In: *Molecular Cell Biology.* New York: W. H. Freeman; 2015.
14. Weaver RF. *Molecular Biology.* 4th ed. MCGraw-Hill, editor. New York: McGraw-Hill; 2008. 625-628 p.
15. Redko Y, Li de la Sierra-Gallay I, Condon C. When all's zed and done: the structure and function of RNase Z in prokaryotes. *Nat Rev Microbiol.* 2007 Apr;5(4):278–86.
16. Hartmann RK, Gössringer M, Späth B, Fischer S, Marchfelder A. The making of tRNAs and more - RNase P and tRNase Z. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2009 Jan;85:319–68.
17. Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(12):1686–701.
18. Ceballos M, Vioque A. tRNase Z. *Protein Pept Lett.* 2007 Jan;14(2):137–45.
19. Olea-Hernández J-E. Clonación, purificación y caracterización cinética de la RNasa Z de *E. coli*. UNAM; 2013.
20. Tu Z, He G, Li KX, Chen MJ, Chang J, Chen L, et al. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains.

- Electron J Biotechnol. 2005;8(1):113–20.
21. Swiss Institute of Bioinformatics. ProtParam [Internet]. [cited 2014 Jan 1]. Available from: <http://web.expasy.org/protparam/>
 22. Daiyasu H, Osaka K, Ishino Y, Toh H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. FEBS Lett. 2001 Aug 10;503(1):1–6.
 23. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, et al. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. Methods Enzymol. 2009 Jan;463:439–73.
 24. Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. JBIC J Biol Inorg Chem. 2008 Nov 5;13(8):1205–18.
 25. Ben-David M, Wieczorek G, Elias M, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Catalytic metal ion rearrangements underline promiscuity and evolvability of a metalloenzyme. J Mol Biol. Elsevier Ltd; 2013;425(6):1028–38.
 26. Republic C. Coordination geometries of selected transition metal ions (Co²⁺, Ni²⁺). 1998;71.
 27. Irving H, Williams RJP. Order of Stability of Metal Complexes. Nature. 1948 Nov 6;162(4123):746–7.
 28. Foster AW, Robinson NJ. Promiscuity and preferences of metallothioneins: the cell rules. BMC Biol. 2011;9(1):25.
 29. Ercan A, Park HI, Ming L-J. Remarkable enhancement of the hydrolyses of phosphoesters by dinuclear centers: Streptomyces aminopeptidase as a “natural model system.” Chem Commun. The Royal Society of Chemistry; 2000 Jan 1;(24):2501–2.
 30. Jonas S, van Loo B, Hyvönen M, Hollfelder F. A new member of the alkaline phosphatase superfamily with a formylglycine nucleophile: structural and kinetic characterisation of a phosphonate monoester hydrolase/phosphodiesterase from Rhizobium leguminosarum. J Mol Biol. 2008 Dec 5;384(1):120–36.
 31. Ghanem E, Li Y, Xu C, Raushel FM. Characterization of a phosphodiesterase capable of hydrolyzing EA 2192, the most toxic degradation product of the nerve agent VX. Biochemistry. American Chemical Society; 2007 Aug 7;46(31):9032–40.
 32. Keppetipola N, Shuman S. Characterization of the 2',3' cyclic phosphodiesterase activities of Clostridium thermocellum polynucleotide kinase-phosphatase and bacteriophage lambda phosphatase. Nucleic Acids Res. 2007 Jan;35(22):7721–32.
 33. Hehir MJ, Murphy JE, Kantrowitz ER. Characterization of heterodimeric alkaline phosphatases from Escherichia coli: an investigation of intragenic complementation. J Mol Biol. 2000 Dec 8;304(4):645–56.
 34. Tibbitts TT, Xu X, Kantrowitz ER. Kinetics and crystal structure of a mutant Escherichia coli alkaline phosphatase (Asp-369 → Asn): A mechanism involving one zinc per active site. Protein Sci. 1994 Nov;3(11):2005–14.
 35. van Loo B, Jonas S, Babbie AC, Benjdia A, Berteau O, Hyvonen M, et al. An efficient, multiply promiscuous hydrolase in the alkaline phosphatase superfamily. Proc Natl Acad Sci. 2010 Feb 16;107(7):2740–5.
 36. Baier F, Chen J, Solomonson M, Strynadka NCJ, Tokuriki N. Distinct Metal Isoforms Underlie Promiscuous Activity Profiles of Metalloenzymes. ACS Chem Biol. 2015;150409093619004.

9. Anexos

9.1. Detalle del análisis de la primera secuenciación (GeneScript)

9.1.1. Construcción WT

Alignment of Sequence_1: [Gen RNasa Z.xdna] with
Sequence_2: [WT Promotor T7.xdna]
Similarity : 873/931 (93.77 %)

```
Seq_1 1 -----at 2
Seq_2 1 GCTAAACGTACATCCCTCTAGAATAATTTGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATAT 60
Seq_1 3 ggaattaatttttaggtacttcagccgggtgccaaccgcacgcgcaatgtcacggc 62
Seq_2 61 GGAATTAATTTTTTAGTACTTCACCCGGTGTGCCAACCCGACGCAATGTCACGGC 120
Seq_1 63 aatattgcttaacctgcaacatccgaccagagcggaactttggtgtttgactgcggtga 122
Seq_2 121 AATATTGCTTAACCTGCAACATCCGACCCAGAGCGGACTTTGGTTGTTGACTGCGGTGA 180
Seq_1 123 aggcaccagcatcagctactgcataccgccttaacctggaaaactggacaagatttt 182
Seq_2 181 AGGCACCCAGCATCAGCTACTGCATACCGCCTTAACCTGAAAACCTGGACAAGATTTT 240
Seq_1 183 taccagtcaccttcagggcatcatcttttgggtttaccggcttgcgtgacgtcgttc 242
Seq_2 241 TATCAGTCACCTTCATGGCGATCATCTTTTGGTTTACCCGGCTTGGTGTGACGTCGTTC 300
Seq_1 243 tatgtcaggcattatccaaccttaacgatttatggtccgcaaggatccgtgaattgt 302
Seq_2 301 TATGTCAGGCATTATCCAACCTTAACGATTTATGTCGCGCAAGGTATCCGTGAATTTGT 360
Seq_1 303 ggaaccgcgctcgggattagcggctcatggacogattatccgctggaattgtcgaaat 362
Seq_2 361 GGAACCCGCGCTCGGATAGCGGCTCATGGACCGATTATCCGCTGAAATTGTCGAAAT 420
Seq_1 363 tggcgctggcgaaattctcgatgatggcctgcgcaaaagtaaccgcttatccgctggaaca 422
Seq_2 421 TGGCGCTGGCGAAATTCGATGATGGCTCGCAAAGTAACCGCTTATCCGCTGGAACA 480
Seq_1 423 cccactggaatgttatggctatcgtattgagaacatgataaacggggtgcattaaatgc 482
Seq_2 481 CCCACTGGAATGTTATGGCTATCGTATTGAAGAACATGATAAACGGGTGCATTAATGC 540
Seq_1 483 ccaggcattaaaagctgctggcgtgcccctggcccactgtttcaggaaataaaagcggg 542
Seq_2 541 CCAGGCATTAAAAGCTGCTGGCCTGCCCTGGCCCACTGTTTCAGGAATTAAGCGGG 600
Seq_1 543 caaacaatcacgctggaagatggaaggcagattaaacggcgagattacttagctgctcc 602
Seq_2 601 CAAAACAATCACGCTGGAAGATGGAAGGCAGATTAAACGGCGCAGATTACTTAGCTGCTCC 660
Seq_1 603 agtgccaggtaaaagcgtcgtatatttcggcgataaccggcccctgctgacgcccacttga 662
Seq_2 661 AGTGCCAGGTAAGCGCTCGCTATTTTCGGCGATACCGCCCTGGGATGCGCACCTTGA 720
Seq_1 663 cctggctaagggtgctgattgctggtgcacgaagcgacgctggatataaacatggaagc 722
Seq_2 721 CCTGGCTAAAGGTGTCGATGTCATGTTGACGCAAGCGCAGCTGGATATAACCATGGAAGC 780
Seq_1 723 caaagccaatagtcgcccatacgtctacacgccaggctgcgacactagcccgtgaggg 782
Seq_2 781 CAAAGCCAATAGTCGGGCCATAGCTCTACACGCCAGGCTGCGACACTAGCCCGTGAGGC 840
Seq_1 783 tggagtcggcaagctaatacattaccacgctcagctcgcgctatgatgacaagggtgtcoa 842
Seq_2 841 TGGAGTCGGCAAGCTAATCATTACCACGCTCAGCTCGCGCTATGATGACAAAGGTGTCA 900
Seq_1 843 gcaacctgttacgtgaatgcaggtcaattttccggcgactgaactggcgaatgattcac 902
Seq_2 901 GCACCTGTACGTGAATGCAGGTCAATTTT-----T----- 931
Seq_1 903 cgtgtttaacgttttaa 918
Seq_2 932 ----- 931
```

Alignment of Sequence_1: [Gen RNasa Z.xdna] with
Sequence_2: [WT Terminador T7.xdna]
Similarity : 844/927 (91.05 %)

```
Seq_1 1 atggaattaatttttaggtacttcagccgggtgccaaccgcacgcgcaatgtcacg 60
Seq_2 927 ----- 928
Seq_1 61 gcaatattgcttaacctgcaacatcc-gaccagagcggaactttggtgtttgactgcg 119
Seq_2 927 ----ATGGCTTAACCTTGCAACATCCGACCCAGAGCGGACTTTGGTTGTTGACTGCGG 872
Seq_1 120 tgaaggcaccagcatcagctactgcataccgccttaacctggaaaactggacaagat 179
Seq_2 871 TGAAAGCACCCAGCATCAGCTACTGCATACCGCCTTAACCTGAAAACCTGGACAAGAT 812
Seq_1 180 ttttatcagtcaccttcagggcatcatcttttgggtttaccggcttgcgtgacgtc 239
Seq_2 811 TTTTATCAGTCACCTTCATGGCGATCATCTTTTGGTTTACCCGGCTTGCCTGTGACGTCG 752
Seq_1 240 ttctatgtcaggcattatccaaccttaacgatttatggtccgcaaggatccgtgaatt 299
Seq_2 751 TTCTATGTCAGGCATTATCCAACCTTAACGATTTATGGTCCGCAAGGTATCCGTGAATT 692
Seq_1 300 tgtggaaccgcgctcgggattagcggctcatggaccgattatccgctggaattgtcga 359
Seq_2 691 TGTGGAACCCGCGCTCGGATTAGCGGCTCATGGACCGATTATCCGCTGGAATTTGTCGA 632
Seq_1 360 aattggcgctggcgaaattctcgatgatggcctgcgcaaaagtaaccgcttatccgctgga 419
Seq_2 631 AATTGGCGCTGGCGAAATTCGATGATGGCCTGCGCAAAAGTAACCGCTTATCCGCTGGA 572
Seq_1 420 acaccctggaatgttatggctatcgtattgagaacatgataaacggggtgcattaaa 479
Seq_2 571 ACACCCTAGGAATGTTATGGCTATCGTATTGAAGAACATGATAAACGGGTGCATTAAA 512
Seq_1 480 tgcccaggcattaaaagctgctggcgtgcccctggcccactgtttcaggaaataaaagc 539
Seq_2 511 TGCCCAGGCATTAAAAGCTGCTGGCCTGCCCTGGCCCACTGTTTCAGGAATTAAGAGC 452
Seq_1 540 gggcaaaaacatcacgctggaagatggaaggcagattaaacggcgagattacttagctgc 599
Seq_2 451 GGGCAAAAACATCACGCTGGAAGATGGAAGGCAGATTAAACGGCGCAGATTACTTAGCTGC 392
Seq_1 600 tccagtgccaggtaaaagcgtcgtatatttcggcgataaccggcccctgctgacgcccact 659
Seq_2 391 TCCAGTGCCAGGTAAGCGCTCGCTATTTTCGGCGATACCGCCCTGCGATGCCGCACT 332
Seq_1 660 tgaacctggtaaaaggtgctgatgctggtgcaagaagcagctggatataaacatgga 719
Seq_2 331 TGACCTGGCTAAAGGTGTCGATGTCATGGTGCACGAAGCGACGCTGGATATAACCATGGA 272
Seq_1 720 agccaaaagccaatagtcgcgccatagctctacacgccaggctgcgacactagcccgtga 779
Seq_2 271 AGCCAAAAGCCAATAGTCGGGCCATAGCTCTACACGCCAGGCTGCGACACTAGCCCGTGA 212
Seq_1 780 ggctggagtcggcaagcctaatacattaccacgctcagctcgcgctatgatgacaagggtg 839
Seq_2 211 GGCTGGAGTCGGCAAGCTAATCATTACCACGCTCAGCTCGCGCTATGATGACAAAGGTTG 152
Seq_1 840 tcagcacctgttacgtgaatgcaggtcaattttccggcgactgaactggcgaatgattt 899
Seq_2 151 TCAGCACCTGTTACGTGAATGCAGGTCAATTTTCCGGCGACTGAACCTGGCGAATGATT 92
Seq_1 900 caccgtgttaacgtt-----taa--- 918
Seq_2 91 CACCGTGTAAACGTTCTCGAGCACCAACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAA 32
Seq_1 919 ----- 918
Seq_2 31 AGCCCCGAAAAGCCGAGGGCGCTCCCCC 1
```

9.1.2. Construcción HT

Alignment of Sequence_1: [Gen RNasa Z.xdna] with
Sequence_2: [HT Promotor T7.xdna]
Similarity : 877/935 (93.80 %)

```

Seq_1 1 -----atg 3
Seq_2 1 GCGGAACGACTTCCCTCTAGAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG 60
Seq_1 4 gaattaatTTTTtaggtacttcagccggtgtgccaacccgcacgcgcaatgtcacggca 63
Seq_2 61 GAATTAATTTTTTAGGTACTTCAGCCGGTGTGCCAACCGCACGCGCAATGTCACGGCA 120
Seq_1 64 atattgcttaacctgcaacatccgacccagagcggactttggttggttactgctgaa 123
Seq_2 121 ATATTGCTTAACCTGCAACATCCGACCCAGAGCGGACTTTGGTTGTTGACTGCGGTGAA 180
Seq_1 124 ggcaccagcatcagctactgcataccgctttaaccctggaaaaactggacaagat 183
Seq_2 181 GGCACCCAGCATCAGCTACTGCATACCCGCTTAAACCTGGAAAACCTGGACAAGATTTT 240
Seq_1 184 atcagtcacctcatggcgatcatcttttggttaccgctgtgctgctgctgct 243
Seq_2 241 ATCAGTACCTTCATGGCGATCATCTTTTGGTTTACCAGCTGTGCTGCACTGCTCT 300
Seq_1 244 atgtcaggcattatccaacccttaacgattttatggctcgcgaaggtatccgtgaatt 303
Seq_2 301 ATGTCAGGCATTATCCAACCCCTAACGATTTATGGTCCGCAAGGTATCCGTGAATTTG 360
Seq_1 304 gaaaccgctgctgggattagcggctcatggaccgattatccgctggaattgtcgaa 363
Seq_2 361 GAAACCCGCTGCGGATTAGCGCTCATGACCGGATTAACCGTGAATTTGCGAAAT 420
Seq_1 364 ggcgctggcgaattctcgatgatggcctgcaaaagtaaccgcttatccgctggaac 423
Seq_2 421 GGCCTGGCAAAATTCGATGATGGCTGCGCAAAAGTAAACCGCTTATCCGCTGGAAC 480
Seq_1 424 ccactggaatggtatggctatcgctattgaagaacatgataaacccggtgcaata 483
Seq_2 481 CCCTGGAATGTTATGGCTATCGTATTTGAAGAACATGATAAACCGGTCATTAATG 540
Seq_1 484 caggcattaaaagctgctggcgtgcccctgcccactgtttcaggaataaaagcg 543
Seq_2 541 CAGCATTAAGAGCTGCTGGCGTCCGCTGGCCACTGTTTTCAGGAATTAAGCGG 600
Seq_1 544 aaaacaatcacgctggaagatggaagcagattaacgcccagattacttagctgct 603
Seq_2 601 AAAACAATCACGCTGGAAGATGGAAGCGAGATTAACCGCGAGATTAAGTGTGCT 660
Seq_1 604 gtgccaggtaaaagcctgctatcttccgcataccgcccctgctgctgctgctg 663
Seq_2 661 GTGCCAGTAAAGCGTCTGCTATTTTCCGCGATACCGCCCTGCGATGCGCGACT 720
Seq_1 664 ctggctaaagtgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg 723
Seq_2 721 CTGGCTAAAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 780
Seq_1 724 aaagccaatagtcggccatagctctacacgcccagctgctgctgctgctgctg 783
Seq_2 781 AAAGCCAATAGTCGGCCATAGCTCTACACGCCAGCTGCGACTAGCCCGTAGG 840
Seq_1 784 ggagtcggaagtaataattaccacgctgctgctgctgctgctgctgctgctg 843
Seq_2 841 GGAGTCGGAAGTAATCATTACCCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 900
Seq_1 844 cacctgttactgtaagtcaggtcaatcttcccgccgactgaaactggcgaatg 903
Seq_2 901 CACCTGTTACTGTAATGCAAGTCAATTTTCCC--CGC----- 935
Seq_1 904 gtgtttaaagctttaa 918
Seq_2 936 ----- 935

```

Alignment of Sequence_1: [Gen RNasa Z.xdna] with
Sequence_2: [HT Terminador T7.xdna]
Similarity : 872/947 (92.08 %)

```

Seq_1 1 atggaattaatTTTTtaggtacttcagccggtgtgccaacccgcacgcgcaatg-tcac 59
Seq_2 947 -----CGCGCAATGTTTAC 934
Seq_1 60 ggcaatattgcttaacctgcaacatccgacccagagcggactttggttggttactgctg 119
Seq_2 933 GGCAATATGCTTAACCTGCAACATCCGACCCAGAGCGGACTTTGGTTGTTGACTGCG 874
Seq_1 120 tgaaggcaccagcatcagctactgcataccgctttaaccctggaaaaactggacaag 179
Seq_2 873 TGAAGGCACCCAGCATCAGCTACTGCATACCGCTTAAACCTGGAAAACCTGGACAAG 814
Seq_1 180 ttttatcagtcacctt-catggcgatcatcttttggttaccgctgtgctgctgctg 238
Seq_2 813 TTTTATCAGTCACTTTCATGGCGATCATCTTTTGGTTTACCAGCTGTGCTGCGAGTC 754
Seq_1 239 gttctatgctcaggcattatccaacccttaacgattttatggctcgcgaaggtatcc 298
Seq_2 753 GTTCTATGTCAGGCATTATCCAACCCCTAACGATTTATGGTCCGCAAGGTATCCGT 694
Seq_1 299 ttgtgaaaaccgctgctgggattagcggctcatggaccgattatccgctggaattgt 358
Seq_2 693 TTGTGAAAACCGCTGCGGATTAGCGGCTCATGACCGGATTAACCGTGAATTTGTCG 634
Seq_1 359 aaattggcctgctggcaaatctcgatgatggcctgcaaaagtaaccgcttatccgct 418
Seq_2 633 AAATTGGCGCTGCGAAATTCGATGATGGCTGCGCAAAAGTAAACCGCTTATCCGCT 574
Seq_1 419 aacacccactggaatggtatggctatcgctattgaagaacatgataaacccggtgca 478
Seq_2 573 AACACCCACTGGAATGTTATGGCTATCGTATTGAAGAACATGATAAACCGGTCATTA 514
Seq_1 479 atgccaggcattaaaagctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct 538
Seq_2 513 ATGCCAGGCATTAAGGCTGCTGCGCTGCGCCCTGCGCCACTGTTTTCAGGAATTA 454
Seq_1 539 cgggcaaaaacaatcacgctggaagatggaagcagattaacgcccagattacttagct 598
Seq_2 453 CGGGCAAAACAATCACGCTGGAAGATGGAAGCGAGATTAACCGCGAGATTAAGT 394
Seq_1 599 ctccagtgccaggtaaaagcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct 658
Seq_2 393 CTCCAGTGCCAGGTAAAGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 334
Seq_1 659 ttgacctggctaaagtgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct 718
Seq_2 333 TTGACCTGGCTAAAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 274
Seq_1 719 aagccaaaagccaatagtcgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct 778
Seq_2 273 AAGCCAAAAGCCAATAGTCGCGCCATAGCTCTACACGCCAGGCTGCGACACTAGCC 214
Seq_1 779 aggctggagtcggcaagctaatcattaccacgctgctgctgctgctgctgctgct 838
Seq_2 213 AGGCTGGAGTCGGCAAGCTAATCATTACCCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 154
Seq_1 839 gtcagcacctgttactgtaagtcaggtcaatcttcccgccgactgaaactggcgaat 898
Seq_2 153 GTCAGCACCTGTTACTGTAATGCAAGTCAATTTTCCCGGCACTGAACTGGCGAATG 94
Seq_1 899 tcaccgtgtttaaagctttaa----- 918
Seq_2 93 TCACCCTGTTTAACTGCTGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTA 34
Seq_1 919 ----- 918
Seq_2 33 ACAAGCCCCGAAGGAAGGCTGATGGTTCTGC 1

```

9.2. Detalle del análisis de la segunda secuenciación (Instituto de Ecología, UNAM)

9.2.1. Construcción WT

Alignment of Sequence_1: [Gen RNasa Z.xdna] with
Sequence_2: [WT Promotor T7 IE UNAM.xdna]
Similarity : 918/1149 (79.90 %)

```
Seq_1 1 -----atggaat 7
Seq_2 1 TGCACGCTCCCTCTAGAATAAATTTGTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGAAT 60
Seq_1 8 taatTTTTtaggtacttcagccggtgtgccaacccgcagcgcaatgtcacggcaatat 67
Seq_2 61 TAAATTTTTAGGTACTTCAGCCGGTGTGCCAACCCGCAGCGCAATGTACAGGCAATAT 120
Seq_1 68 tgcttaacctgcaacatccgaccagagccagctttgggtggtttgactgcggtgaaggca 127
Seq_2 121 TGCTTAACCTGCAACATCCGACCAGAGCGGACTTTGGTTGTTGACTGCGGTGAAGGCA 180
Seq_1 128 ccagcagcatcagctactgcataccgctttaacccctggaactggacaagatttttatca 187
Seq_2 181 CCCAGCATCAGCTACTGCATACCCGCTTTAACCTGGAAAAGTGGACAAGATTTTTATCA 240
Seq_1 188 gtcaccttcattggcgatcattctttttggtttaccggcttgctgtgcagctgcttctatgt 247
Seq_2 241 GTCACCTTCATGGCGATCATCTTTTGGTTTACCAGCTTGCCTGTCAGTCTGTCTATGT 300
Seq_1 248 caggcattatccaaccottaacgattttatggcgcgaaggtatccgtgaatttgggaaa 307
Seq_2 301 CAGGCATTTATCCAACCTTAACGATTTATGGTCCGCAAGGTATCCGTGAATTTGTGAAA 360
Seq_1 308 ccgcgctgaggattagcgctcatggaccgattatccgctggaattgtcgaattggcg 367
Seq_2 361 CCGCGCTGCGGATAGCGCTCATGGACCATTTCGCTGGAATTTGCGAATTTGGCG 420
Seq_1 368 ctggcgaattctcagatgatgctcgccgcaagaatccgcttatccgctggaaccaccac 427
Seq_2 421 CTGGCAAAATTCATGATGATGCCCTGCCAAGTAACCGCTTATCCGCTGGAACACCAC 480
Seq_1 428 tggaaattgttgctatcgatttgaagaacatgataaacgggtgcattaaatgccagg 487
Seq_2 481 TGAATTTATGGTATCGTATTTGAAGAACATGATAAACCGGGTGCATTAATGCCAGG 540
Seq_1 488 cattaaaagctgctggcgtgcccctggcccactgtttcaggaattaaaagcgggcaaaa 547
Seq_2 541 CATTAAAAGCTGCTGGCGTCCGCCCTGGCCACTGTTTCAGGAATTAAGCGGGCAAAA 600
Seq_1 548 caatcaagctggaagatggaagcgagattaacggcgagattacttagctgctccagctg 607
Seq_2 601 CAATCAGCTGGAAGATGGAAGGCAGATTAACGGCGCAGATTACTTAGCTGCTCCAGTGC 660
Seq_1 608 caggtaaacgctgctgctatttttcggcgataccggcccctgcgcatgcccactttgacctg 667
Seq_2 661 CAGGTAAGCGCTCGCTATTTTCGGCGATACCGCCCTCGCATGCCGCACCTTGACCTGG 720
Seq_1 668 ctaaagggtgctgattgatggtgacgaagcgacgctgataataacctggaagccaag 727
Seq_2 721 CTAAAGGTGTCGATGTCATGGTGCACGAAGCGACGCTGGATATAACCATGGAAGCCAAG 780
Seq_1 728 ccaatagtcgcgccatagctctacacgcaagctgcaactagccgctgagctggag 787
Seq_2 781 CCAATAGTCGCGCCATAGCTCTACACGCCAGGCTGCGACACTAGCCCGTGAGGCTGGAG 840
Seq_1 788 tcggcaagctaatcattaccacgctcagctcgcctatgatgacaaaggttgcagcacc 847
Seq_2 841 TCGCAAGCTAATCATTACCCAGCTCAGCTCGCGCTATGATGACAAAGTTGTGACGACC 900
Seq_1 848 tggtaagtgatgcaaggtcaattttccggcgactgaactggcgaatgatttccagctgt 907
Seq_2 901 TGTTACGTGAATGCAAGTCAATTTCCCGGCGACTGAACGGCGAATGATTTACCGTGT 960
Seq_1 908 ttaacgcttaa----- 918
Seq_2 961 TTAACGTTTAACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCCAGTGTAAACAAAGCC 1020
Seq_1 919 ----- 918
Seq_2 1021 CGAAAGGGAAGCTGAGTTGGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATACTAGCATAACCCGTTG 1080
Seq_1 919 ----- 918
Seq_2 1081 GGGCTTAACCGGCTTTGAGGTTTGTCTGAAGAAGAACTATATCCGGAATTGACGATGGG 1140
Seq_1 919 ----- 918
Seq_2 1141 GACCCCGC 1149
```

Alignment of Sequence_1: [Gen RNasa Z.xdna] with
Sequence_2: [WT Terminador T7 IE UNAM.xdna]
Similarity : 918/1168 (78.60 %)

```
Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1168 GACGGCCACAGGCAAAATCCGGCACCTTTGTTGGGCGCCGGTGGATGCAGTCACGAATGC 1109
Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1108 GTCGCGTAGAGGGATCGAGATCTCGATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGAA 1049
Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1048 TGTGAGCGGATAACAATTCCTCCTAGAATAAATTTGTTTAACTTAAAGAAGGGAGAT 989
Seq_1 1 -----atggaattaattttttt-aggtacttcag-cgggtgtgccaacccgcagcgca 52
Seq_2 988 ATACATATGGAATTAATTTTTTTTAGGTACTTCAGCCGGTGTGCCAACCCGCACGGCA 929
Seq_1 53 atgtcacggcaaatattgttcaacctgcaacatccgaccagagcggaactttgggttttg 112
Seq_2 928 ATGTCACGGCAATATTGCTTAACTGCAACATCCGACCAGAGCGGACTTTGGTGTGTG 869
Seq_1 113 actgcggtgaaggcaccagcagcagctactgcataaccgctttaaccctggaactgg 172
Seq_2 868 ACTGCGGTGAAGCACCAGCATCAGCTACTGCATACCCGCTTTAACCTGGAAAAGTGG 809
Seq_1 173 acaagattttatcagtcacctcattcggcgatcattcttttgggtttaccggtgtgctg 232
Seq_2 808 ACAAGATTTTATCAGTCACCTTCATGGCGATCATCTTTTGGTTTACCAGCTTGTCTGT 749
Seq_1 233 gcagctgcttctatgtcagcattatccaaccttaacgatttatggtccgcaaggtatcc 292
Seq_2 748 GCAGTCGTCTATGTCAGGCATTTCAACCTTAACGATTTATGGTCCGCAAGGTATCC 689
Seq_1 293 gtgaattgtggaaccgctgaggattagcggctcattggaagcattatccgctgga 352
Seq_2 688 GTGAATTTGGAACCCGCTCGGATTAGCGGCTATGGAACGATTAACCGCTGGA 629
Seq_1 353 ttgtgaaattggcgtggcgaattctcagatgatgctgcaaggaattaccgcttacc 412
Seq_2 628 TTGTCGAAATTTGGCGTGGCGAAATTTCTCGATGATGGCTGCCAAGTAACCGCTTATC 569
Seq_1 413 cgctggaacaccactggaattgtttggtatcgtattgaagaacatgataaacgggtg 472
Seq_2 568 CGCTGGAACACCACCTGGAATGTTATGCTATCGTATTGAAGAACATGATAAACCGGTG 509
Seq_1 473 cattaaatgcccaggcattaaaagctgctgcccctgcccactgtttcaggaat 532
Seq_2 508 CATTAAATGCCAGGCATTAAGCTGCTGGCGTCCGCCCTGGCCACTGTTTCAGGAAT 449
Seq_1 533 taaaagcgggcaaaaacaatcagctggaagatggaagcagattaacggcgagattact 592
Seq_2 448 TAAAAGCGGGCAAAACAATCAGCTGGAAGATGGAAGCAGATTAACGGCGCAGATTACT 389
Seq_1 593 tagctgctccagtgccaggtaaagcctgctattttcggcgataccgcccctgcgag 652
Seq_2 388 TAGCTGCTCCAGTGCCAGGTAAAGCGCTCGCTATTTTCGGCGATACCGCCCTGGGATG 329
Seq_1 653 ccgcacttgacctggctaaaggtgtcagtgctatggtgcaagcagcagctggaataa 712
Seq_2 328 CCGCACTTGACCTGGCTAAAGGTGTCGATGTCATGTTGCACGAAGCGACGCTGGATATA 269
Seq_1 713 ccatggaagcacaagcaatagtgcggccatagctctacacgcaagctgcaacactag 772
Seq_2 268 CCATGGAAGCCAAAGCAATAGTGCGGCCATAGCTCTACACCCAGGCTGCCACTAG 209
Seq_1 773 cccgtgaggctggagtggcaagcctaatcattaccacgctcagctcgcctatgatgaca 832
Seq_2 208 CCGTGAGGCTGGAGTCGGCAAGCTAATCATTACCACGTCAGCTCGGCTATGATGACA 149
Seq_1 833 aagttgtcagcactgttactgtaagtcaggtcaattttccggcgactgaaactggcga 892
Seq_2 148 AAGTTGTGACGACTGTTTACTGTAATGCAAGTCAATTTCCCGGCGACTGAACTGGCGA 89
Seq_1 893 atgattccagctgtttaaactgctaa----- 918
Seq_2 88 ATGATTTACCGTGTTTAACTGAGCACCACCACCACCACCACCTGAGATCCGG 29
Seq_1 919 ----- 918
Seq_2 28 CTGCTAACAAAGCCGAAAGAGCTAACC 1
```

9.2.1. Construcción WT

Alignment of Sequence_1: [Gen RNasa Z.xdna] with
Sequence_2: [HT Promotor T7 IE UNAM.xdna]
Similarity : 918/1151 (79.76 %)

```
Seq_1 1 -----atgga 5
Seq_2 1 TACGGTACATTCCCTCTAGAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGA 60
Seq_1 6 attaatTTTTtaggtacttcagccggtgtgccaaccgcacgcgcaatgtcacggcaat 65
Seq_2 61 ATTAATTTTTTAGGTACTTCAGCCGGTGTGCCAACCCGACGCGCAATGTACGGCAAT 120
Seq_1 66 attgcttaacctgcaacatccgaccagagcggactttggtgtttgactgoggtgaag 125
Seq_2 121 ATTGCTTAACCTGCAACATCCGACCCAGAGCGGACTTTGGTTGTTGACTGCGGTGAAG 180
Seq_1 126 caccagcatcagctactgcataccgctttaaccctggaaaaactggacaagatTTTTat 185
Seq_2 181 CACCAGCATCAGTACTGCATACCGCTTTAACCCCTGGAAAACTGGACAAGATTTTAT 240
Seq_1 186 cagtcaacctcagcggatcatctTTTTggtttaccgctgtgtgtgagtcgttctat 245
Seq_2 241 CAGTCAACCTCATGGCGATCATCTTTTTGGTTTACCOCGCTTGTGTGAGTCTGTTCTAT 300
Seq_1 246 gtcaggcattatccaacccttaacgattttatggtccgcaaggtatccgtaaatTTgtgga 305
Seq_2 301 GTCAGGCATTATCCAACCCCTAACGATTATGGTCCGCAAGGTATCCGTAATTTGTGGA 360
Seq_1 306 aaccgcgctcgggattagcggctcatggaccgattatccgctggaaattgtcgaattgg 365
Seq_2 361 AACCGCGCTGCGGATTAGCGGCTCATGGACGATTATCCGCTGGAAATGTGCAAAATGG 420
Seq_1 366 cgctggcgaattctcagatgatggcctgcgcaaaagtaaccgcttatccgctggaacacc 425
Seq_2 421 CGCTGGCGAAATTCGATGATGGCCTGCGCAAAAGTAACCGCTTATCCGCTGGAACACC 480
Seq_1 426 actggaatgttatggctatcgttatgaaagaacatgataaacccgggtgcattaaatgccca 485
Seq_2 481 ACTGGAATGTTATGGCTATCGTATTGAAGAACATGATAAACCCGGTGCATTAATGCCCA 540
Seq_1 486 ggcattaaaagctgctggctgcccctggcccactgtttcaggaataaaagcgggcaa 545
Seq_2 541 GGCAATAAAAGCTGCTGGCTGCCCTGGCCACTGTTTACGGAATAAAAGCGGGCAA 600
Seq_1 546 aacaatcacgctggaagatggaagcagatataacggcgcagattacttagctgtccagt 605
Seq_2 601 AACAAATCACGCTGGAAGATGGAAGCGAGATTAACGGCGCAGATTACTTAGCTGTCCAGT 660
Seq_1 606 gccaggtaaagcgtcgctatTTTcgcgataaccggccctcgcgatccgcacttgacct 665
Seq_2 661 GCCAGGTAAGCGCTCGCTATTTTCCGCGATACCGCCCTGCGATGCCGCACCTGACCT 720
Seq_1 666 ggctaaaggtgtcagatgtcaggtgtcagcaagcagcgtggatataaccatggaagccaa 725
Seq_2 721 GGCTAAAAGGTGTCGATGTATGTTGACGAAGCGACGCTGGATATAACCATGGAAGCCAA 780
Seq_1 726 agccaatagtcgcccatacgtctacacgccagcgtgcgacactagcccgtaggctgg 785
Seq_2 781 AGCCAAATAGTCGGCCATAGCTCTACACGCCAGGCTGCGACACTAGCCCGTAGGCTGG 840
Seq_1 786 agtcggcaagctaatcattaccacgctcagctcgcgctatgatgacaaggttgtcagca 845
Seq_2 841 AGTCGGCAAGCTAATCATTACCCACGCTCAGCTCGCGCTATGATGACAAGGTTGTGACGA 900
Seq_1 846 cctgttacgtgaatgcaggtcaatttt-cccggcgactgaactggcgaatgatttcaccg 904
Seq_2 901 CCTGTTACGTGAATGCAGGTCAATTTTCCCGGCGACTGAACTGGCGAATGATTTACCCG 960
Seq_1 905 tgtttaacggtt-----taa----- 918
Seq_2 961 TGTTTAACGTTCTCGAGCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCC 1020
Seq_1 919 ----- 918
Seq_2 1021 CGAAAGGAGCTGAGTTGGGCTGCTGCACGGCTGAGCATACTAGCATACCCCTGGTCTCT 1080
Seq_1 919 ----- 918
Seq_2 1081 AACGGTCTTGAGGGTTTTTTTGCCTGAAGGAGTACCTATATTCGGAATGCGGATGGACG 1140
Seq_1 919 ----- 918
Seq_2 1141 GCCGCCCTAG 1151
```

Alignment of Sequence_1: [Gen RNasa Z.xdna] with
Sequence_2: [HT Terminador T7 IE UNAM.xdna]
Similarity : 918/1187 (77.34 %)

```
Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1187 CATTCCGCTGTGAGTTCGCGATATAGCGAGCAATCGGCACCTGTGGCCCGGTGATGCC 1128
Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1127 CGTCAACGATTGCGTTCGCGTAGAGATCCGAGGATCCGATTCGCCGGAATTTAAT 1068
Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1067 ACCGAACTCACTTATTAGGGAAATGTGAGCGGATTACAATCCCCCTAGAAATAATT 1008
Seq_1 1 -----atggaatatttttttaggtacttcagccgg 32
Seq_2 1007 TGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGAATTAATTTTTTAGTACTTCAGCCGG 948
Seq_1 33 tgtgccaaccgcacgcgcaatgtcacggcaatattgcttaacctgcaacatccgacca 92
Seq_2 947 TGTGCCAACCCGACGCGCAATGTACGGCAATATTGCTTAACTGCAACATCCGACCCA 888
Seq_1 93 gagcggactttggtgtttgactgoggtgaaggcaccagcatcagctactgcataccgc 152
Seq_2 887 GAGCGGACTTTGGTTGTTGACTGCGGTAAGGCAACCCAGCATCAGCTACTGCATACCGC 828
Seq_1 153 ctttaaccctggaaaaactggacaagaattttatcagtcacctcatggcgatcatcttt 212
Seq_2 827 CTTTAACCCCTGAAAACTGGACAAGATTTTATCAGTCACTTCATGGCGATCATCTTT 768
Seq_1 213 tggtttaaccggctgtcgtgtcagctcgttctatgtcaggcattatccaacccttaacgat 272
Seq_2 767 TGGTTTACCAGGCTGCTGTGCGAGTCTCTATGTGAGGCATTAACAACCCCTAACGAT 708
Seq_1 273 ttatggtccgcaaggtatccgctgaattgtggaaccgctcgggattagcggctcatg 332
Seq_2 707 TTATGGTCCGCAAGGTATCCGTAATTTGTGGAACCCGCTGCGGATTAGCGGCTCATG 648
Seq_1 333 gaccgattatccgctggaattgtcgaattggcgctggcgaattctcagatgatggcct 392
Seq_2 647 GACCGATTATCCGCTGGAATTTGCGAATTTGGCGTGGCGAATTCGATGATGGCCT 588
Seq_1 393 ggcgaagtaaccgcttatccgctggaacaccactggaattgttatggctatcgtattga 452
Seq_2 587 GCCCAAGTAACCGCTTATCCGCTGGAACACCCTGGAATGTTATGGCTATCGATTGGA 528
Seq_1 453 agaacatgataaaaccgggtgcattaaatgccaggcattaaaagctgtggcgtgccc 512
Seq_2 527 AGAACATGATAAACCCGGTGCATTAATGCCAGGCAATAAAGCTGTGCGGTGCCGCC 468
Seq_1 513 tggcccactgtttcaggaataaaagcgggcaaaacaatcacgctggaagatggaaggca 572
Seq_2 467 TGGCCCACTGTTTACAGGAATTAAGAAGCGGGCAAAACAATCACGCTGGAAGATGGAAGCA 408
Seq_1 573 gattaacggcgcagattacttagctgtccagtgccaggtaaaagcgtcgtatTTTcgg 632
Seq_2 407 GATTAACGGCCAGATTACTTAGTCTCCAGTGCCAGGTAAGCGCTCGCTATTTTCGG 348
Seq_1 633 cgataccggccctcgcgatgcccacttgacctggctaaaggtgtcagatgtcaggtgca 692
Seq_2 347 CGATACCGGCCCTGCGATGCCGACTTGACCTGGCTAAAGGTGTGATGTATGTTGCA 288
Seq_1 693 cgaagcgcgctggatataaccatggaagcgaagcgaatagtcggccatagctctac 752
Seq_2 287 CGAAGCGCGCTGGATATAACCATGGAAGCAGCAAGCAATAGTCCGCGCCATAGCTCTAC 228
Seq_1 753 acgccaggctgcgacactagcccgtgaggtgagtgccgcaagctaatcattaccacgt 812
Seq_2 227 ACGCCAGGCTGCGACACTAGCCGCTGAGGCTGGAGTCCGCAAGCTAATCATTACCCAGT 168
Seq_1 813 cagctcgcgctatgatgacaaaggttgcagcacctgttaactggaatgcaagctcaatttt 872
Seq_2 167 CAGCTCGCGCTATGATGACAAAGGTTGTGACACCTGTTACGTGAATGCAGGTCAATTT 108
Seq_1 873 cccggcgactgaaactggcgaatgatttcaccggttttaacggtt----- 915
Seq_2 107 CCCGGCGACTGAACTGGCGAATGATTTACCGTGTTAACGTTCTCGAGCACCACCACCA 48
Seq_1 916 -----taa----- 918
Seq_2 47 CCACCACTGAGATCCGGCTGTAAACAAAGCCGAAAGGAGTACCTC 1
```