



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE MUTANTES DEL CITOCROMO
P450_{BM3} PARA HIDROXILAR ÁCIDO *P*-CUMÁRICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Q.F.B. JESÚS MANUEL LÓPEZ MEZA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. GLORIA SAAB RINCÓN
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)

DR. EDMUNDO CASTILLO ROSALES
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Abril, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella
Presidente

Dra. Georgina Garza Ramos Martínez
Secretaria

Dr. José Arcadio Farías Rico
Vocal

Dra. Lilian González Segura
Vocal

Dr. Armando Hernández García
Vocal

El presente proyecto de tesis de maestría se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Gloria Saab Rincón, adscrito al departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en el marco del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

La ejecución de este proyecto fue posible gracias al financiamiento proporcionado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT/UNAM), a través de los proyectos IN211020 e IN226623. Asimismo, se agradece el apoyo brindado por el Programa de Apoyo a los Estudiantes del Posgrado (PAEP).

Cabe destacar, que este trabajo también fue posible gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para estudios de posgrado a nivel maestría, bajo el número de becario 1146337.

DEDICATORIA

A mi madre, María Iliana Meza Márquez

A mis abuelos, Regulo y Delia

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gloria Saab Rincón, por ser fundamental en mi desarrollo personal y profesional al brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su constante apoyo, orientación y generosidad en compartir sus conocimientos en las clases, seminarios y su guía como mi tutora.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Alfredo Martínez y Dr. Edmundo Castillo, por la crítica constructiva y los comentarios oportunos en cada examen. También a los miembros del jurado evaluador: Dr. Lorenzo Segovia, Dra. Georgina Ramos, Dr. José Arcadio, Dra. Lilian González y Dr. Armando Hernández, por sus valiosas aportaciones que enriquecieron el documento escrito de este proyecto.

A los miembros del laboratorio: Ing. Leticia Olvera, por todas las facilidades técnicas, la disposición en orientarme y la confianza prestada con su material de laboratorio; Dra. Wendy Xolalpa, Dr. Humberto Flores y Dr. Xavier Soberón, por la facilitación de herramientas de trabajo y sus comentarios muy acertados durante mis seminarios; C.P. Rubí Robledo, por el apoyo administrativo; Alexey Llopiz y Emma Arévalo, por su colaboración, consejos y compañerismo; Dra. Katy Juárez y Dr. José Alberto Hernández, por su colaboración en actividades dentro del laboratorio; Luis Miguel Rodríguez y Nayely López, por la compañía y ayuda brindada; Don Toño y Juan Carlos, por facilitarnos el trabajo de laboratorio.

A Azeret Rodríguez, por estar conmigo en todo.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt, por sus servicios prestados. A la Unidad de Docencia, especialmente al Lic. Antonio Bolaños, por la gentileza y actitud de estar siempre dispuesto a apoyar. También al MTI. Juan Manuel Hurtado de la Unidad de Cómputo, por sus servicios de soporte brindados.

A la comunidad del Instituto de Biotecnología y de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el respaldo brindado y el entorno académico de muy alta calidad.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
TABLA DE CONTENIDO	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Enzimas como catalizadores	12
1.2 Aplicaciones y limitaciones de las enzimas	12
1.3 Ingeniería de proteínas	13
1.4 Construcción de bibliotecas de mutantes	13
1.5 Tamizaje de bibliotecas de variantes	14
1.6 Citocromos P450	15
1.7 Citocromo P450 de <i>Bacillus megaterium</i> (P450_{BM3})	16
2. ANTECEDENTES	18
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos particulares	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Reactivos químicos y bioquímicos	25
5.2 Reactivos biológicos	25
5.3 Cepas y plásmido	25
5.4 Preparación de células electrocompetentes	26
5.5 Preparación de células quimiocompetentes	26
5.6 Transformación y selección bacteriana	26
5.7 Ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) para contenido de fenoles totales	27
5.8 Ensayo férrico-ferrozina para la capacidad antioxidante total	27
5.9 Construcción de la biblioteca de variantes	28
5.10 Clonación de las librerías	28
5.11 PCR de colonias	29
5.12 Electroforesis de ADN en gel de agarosa	29
5.13 Cultivo y expresión de variantes del P450_{BM3} en formato de cajas de 96 pozos	29

5.14	Consumo de NADPH a $\lambda=340$ nm y tamizaje de variantes	30
5.15	SDS-PAGE	30
5.16	Ensayo por cromatografía en capa fina (TLC).....	31
5.17	Expresión y purificación de variantes de P450 _{BM3}	31
5.18	Espectro absoluto de las proteínas purificadas	32
5.19	Diferencia espectral de unión a sustratos.....	32
5.20	Modelado molecular del P450 _{BM3}	32
5.21	Estrategia experimental.....	34
5.21.1	Determinación de un método de tamizaje en formato de alta eficiencia.....	34
5.21.2	Construcción de la biblioteca de variantes del P450 _{BM3}	35
5.21.3	Tamizaje de la biblioteca y selección de variantes del P450 _{BM3}	37
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1	Determinación de un método de tamizaje en formato de alta eficiencia.....	39
6.1.1	Ensayo de F-C.....	39
6.1.2	Ensayo de Fe(III)-FZ	44
6.2	Construcción de la biblioteca de mutantes del P450 _{BM3}	49
6.2.1	Construcción de variantes en T438.....	49
6.2.2	Construcción de variantes en 47/82/87	51
6.2.3	Construcción de variantes en 328/330	53
6.3	Tamizaje de la biblioteca de variantes del P450 _{BM3}	56
6.3.1	Presencia del P450 _{BM3} y ensayos de actividad.....	56
6.3.2	Tamizaje de la biblioteca empleando el ensayo de Fe(III)-FZ	59
6.4	Construcción de librería acotada.....	63
6.4.1	Construcción <i>in silico</i> de la variante P450 _{BM3} M3 y acoplamiento molecular....	63
6.4.2	Construcción experimental.....	65
6.4.3	Tamizaje de la biblioteca acotada.....	67
6.5	Expresión y purificación de las variantes seleccionadas.....	71
6.6	Espectro absoluto de las proteínas purificadas	73
6.7	Diferencia espectral de unión a sustratos.....	75
6.8	Tercera ronda de construcción de bibliotecas	78
6.8.1	Tamizaje de la biblioteca construida sobre las variantes	79
7.	CONCLUSIONES.....	81
8.	PERSPECTIVAS	82
9.	ANEXOS	83
10.	BIBLIOGRAFÍA	96

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Citocromo P450 en los sistemas de clase I, II y VIII.....	16
<i>Figura 2.</i> Representaciones del P450 _{BM3}	17
<i>Figura 3.</i> Canal de acceso al sustrato y sitio activo del P450 _{BM3}	19
<i>Figura 4.</i> Enzimas que hidroxilan ácido <i>p</i> -cumárico.....	21
<i>Figura 5.</i> Representación 3D de las estructuras cristalográficas.....	23
<i>Figura 6.</i> Ronda de tamizaje de variantes en formato de MTPs.....	33
<i>Figura 7.</i> Método de megaprimer.....	35
<i>Figura 8.</i> Construcción de bibliotecas y selección de variantes.....	37
<i>Figura 9.</i> Formación de color para el ensayo de F-C en formato de MTPs.....	40
<i>Figura 10.</i> Curvas estándar para el ensayo de F-C en condiciones estándar.....	41
<i>Figura 11.</i> Curvas estándar para el ensayo de F-C en presencia de lisado celular.....	42
<i>Figura 12.</i> Curvas estándar para el ensayo de F-C en presencia de lisado celular y NADPH.....	43
<i>Figura 13.</i> Formación de color para el ensayo Fe(III)-FZ en formato de MTPs.....	44
<i>Figura 14.</i> Formación de color en presencia y ausencia de NADPH, para el ensayo de Fe(III)-FZ.....	45
<i>Figura 15.</i> Curvas estándar para el ensayo de Fe(III)-FZ en presencia de lisado celular.....	46
<i>Figura 16.</i> Curvas estándar para el ensayo de Fe(III)-FZ en presencia de lisado celular y NADPH.....	47
<i>Figura 17.</i> Construcción de mutaciones en la posición 438.....	49
<i>Figura 18.</i> PCR de colonias transformantes con mutaciones en 438.....	50
<i>Figura 19.</i> Mutaciones en la posición T438 confirmadas por secuenciación.....	50
<i>Figura 20.</i> Mutagénesis por PCR sobre los sitios 47, 82 y 87.....	51
<i>Figura 21.</i> Análisis de la librería 47/82/87.....	52
<i>Figura 22.</i> Mutaciones en las posiciones 82/87 confirmadas por secuenciación.....	52
<i>Figura 23.</i> Construcción de variantes en A328/330.....	53
<i>Figura 24.</i> Análisis de la librería completa.....	54
<i>Figura 25.</i> Mutaciones en las posiciones 328/330 confirmadas por secuenciación.....	55
<i>Figura 26.</i> Consumo de NADPH a 340 nm obtenida del lisado celular.....	56
<i>Figura 27.</i> Consumo de NADPH a 340 nm del extracto por sonicación.....	57
<i>Figura 28.</i> SDS-PAGE de los lisados celulares.....	58
<i>Figura 29.</i> Ronda de tamizaje con pool de colonias.....	59
<i>Figura 30.</i> Curva estándar de ácido cafeico.....	60
<i>Figura 31.</i> Tamizaje de variantes con el ensayo de Fe(III)-FZ.....	60

Figura 32. Segundo tamizaje de las 60 variantes seleccionadas.	62
Figura 33. TLC.....	62
Figura 34. Acoplamiento molecular de mesitileno.	63
Figura 35. Acoplamiento molecular del ácido <i>p</i> -cumárico.	64
Figura 36. Mutaciones en las posiciones 47 y 51 confirmadas por secuenciación.	66
Figura 37. Mutaciones en la posición 328 y 330 confirmadas por secuenciación.	66
Figura 38. SDS-PAGE de pCWori y pET28a.	67
Figura 39. Curva estándar de ácido cafeico y <i>Abs a</i> $\lambda=562\text{nm}$ del P450 _{BM3} WT.	68
Figura 40. Tamizaje de la librería 47/51/328/330.	69
Figura 41. TLC de las variantes seleccionadas.	70
Figura 42. SDS-PAGE del proceso de purificación del P450 _{BM3} y la variante 2-5E.	71
Figura 43. Gráficas de consumo de NADPH.	72
Figura 44. TLC del P450 _{BM3} y 2-5E.....	73
Figura 45. Espectro absoluto del P450 _{BM3} WT y las variantes purificadas.....	74
Figura 46. Espectro de absorbancia y diferencia espectral en presencia y ausencia de sustratos del P450 _{BM3} WT.	76
Figura 47. Espectro de absorbancia y diferencia espectral en presencia y ausencia de sustratos de la variante 25E.	77
Figura 48. Mutaciones en las posiciones 47/51/82/87/328/330 confirmadas por secuenciación.	78
Figura 49. <i>Abs a</i> $\lambda=562\text{ nm}$ de grupos de variantes con o sin sustrato.	80
Figura 50. Plásmido pET28a.	83
Figura 51. Obtención de fragmento T438/XhoI.....	83
Figura 52. Obtención de megaprimer NcoI/R47.	84
Figura 53. Obtención de fragmento NcoI/R47/82/87.....	84
Figura 54. Obtención de fragmento NcoI/R47/82/87 posterior a SacI.....	85
Figura 55. Obtención de fragmento NcoI/A328/330.	85
Figura 56. Extensión de megaprimer posterior a SacI.	86
Figura 57. Obtención de megaprimer NcoI/R47S/Y51W.....	89
Figura 58. Obtención de fragmento R47/Y51/A328/330.....	89
Figura 59. Extensión de megaprimer posterior a SacI.	90
Figura 60. Obtención de fragmento NcoI/47/51/82/87.	90
Figura 61. Extensión de megaprimer posterior a SacI.	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras cristalográficas empleadas en el análisis <i>in silico</i>	22
Tabla 2. Oligonucleótidos para la construcción de la biblioteca.	28
Tabla 3. Comparación del método de F-C vs el método de Fe(III)-FZ.	48
Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la biblioteca acotada.	65
Tabla 6. Cambios en la secuencia de aminoácidos de las variantes 2-5E, 3-8B y 5-4C.....	70
Tabla 7. Concentración de las proteínas purificadas y su factor Rz.	75
Tabla 8. Combinatoria de aminoácidos obtenida de los oligonucleótidos empleados.....	86

ABREVIATURAS

Å	Angstrom
Abs	Absorbancia
°C	grados Celsius
λ	Longitud de onda
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
kDa	KiloDalton
KPi	Buffer de K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
ddH₂O	Agua bidestilada
IPTG	Isopropil β-D-1 tiogalactopiranosido
RPM	Revoluciones por minuto
pb	pares de bases
PDB	Protein Data Bank
P450_{BM3}	Citocromo P450 de <i>Bacillus megaterium</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MTP	Placa de microtitulación
M	Molar
mM	milimolar
μM	micromolar
mL	mililitro
μL	microlitro
L	Litro
LB	medio Luria-Bertani
ms	milisegundos
mg	miligramo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ng	nanogramo
nm	nanómetro
TB	medio Terrific Broth
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La familia de los citocromos P450 se distingue por llevar a cabo reacciones de oxidación en los enlaces C-H, demostrando un alto grado de quimio-, regio- y estereoselectividad. Entre otros, destaca el citocromo P450 de *Bacillus megaterium* (P450_{BM3}), una enzima autosuficiente conocida por catalizar la hidroxilación de ácidos grasos, mostrando altas tasas catalíticas y buena estabilidad.

El objetivo principal de este proyecto fue la construcción de mutantes del P450_{BM3} mediante un diseño semi racional, con la finalidad de modificar su especificidad para que pueda utilizar el ácido *p*-cumárico como sustrato. Este análisis, previamente realizado por Jorge Jiménez (Jiménez, 2019), empleó acoplamientos moleculares utilizando estructuras cristalográficas conocidas y se apoyó en información ya reportada, lo que permitió identificar los residuos determinantes para la hidroxilación del ácido *p*-cumárico. Se propuso la construcción de la biblioteca combinatoria que incluyera las siguientes variantes: R47R/S, F82/A/S/G, F87/A/G/W, A328/F/V, A330/P/T/K y T438/Y/N/L/V, buscando facilitar el acceso del sustrato y mejorar la afinidad en el sitio activo, lo que permitiría al P450_{BM3} utilizar el ácido *p*-cumárico como sustrato.

La identificación de variantes del P450_{BM3} capaces de hidroxilar ácido *p*-cumárico y potencialmente producir ácido cafeico en la biblioteca de mutantes (aproximadamente 20,000 variantes generadas) requirió de una estrategia de detección eficaz. Para ello, se estableció un método de tamizaje basado en la interacción del complejo Fe(III)-Ferrozina con ácido cafeico en condiciones ácidas. Utilizando un formato en placas de 96 pozos, se logró un límite de detección de 0.04 mM y un rango de detección lineal de 0.04 a 0.4 mM. Se aplicó el ensayo Fe(III)-FZ para el tamizaje de las bibliotecas diseñadas. Se exploraron 2,500 variantes del P450_{BM3} y se seleccionaron cuatro variantes para analizar sus características espectroscópicas y los productos de reacción. Los resultados sugieren que el diseño de bibliotecas semi-racional puede ser una estrategia eficaz para obtener un número reducido de variantes, sin embargo, la exploración completa ha requerido de la optimización de los esfuerzos de selección.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enzimas como catalizadores

En química, un catalizador se define como un compuesto que acelera la velocidad de reacción al disminuir la energía de activación necesaria, y lo hace sin consumirse en el proceso. En el contexto biológico, este papel lo desempeñan las enzimas, moléculas biocatalíticas compuestas por una secuencia de aminoácidos que determinan su estructura tridimensional y que esto presenta una relación con la función que desempeñan (Walsh, 2001). La ventaja distintiva de las enzimas como biocatalizadores radica en su capacidad para operar en condiciones suaves de temperatura, presión y pH. Por el contrario, los catalizadores convencionales utilizados en la industria química, como el rodio, requieren de condiciones de reacción extremas, son poco selectivos, generan productos secundarios y tienen un impacto ambiental negativo (Sheldon y Woodley, 2018; Desai, 2011).

1.2 Aplicaciones y limitaciones de las enzimas

Las enzimas han sido empleadas para la producción de agentes edulcorantes, biocombustibles, detergentes en polvo, fabricación de textiles y de compuestos de interés farmacéutico; además, desempeñan un papel importante en dispositivos de diagnóstico clínico y tratamiento médico (Porter *et al.*, 2016).

A pesar de su versatilidad, las enzimas se enfrentan a ciertas limitaciones en entornos industriales debido a diferencias con su entorno biológico, como el nivel de expresión, solubilidad y estabilidad, así como su actividad catalítica y especificidad hacia sustratos de interés comercial (Sheldon y Brady, 2018). Para superar estas limitaciones, se han implementado estrategias de ingeniería de proteínas, como la evolución dirigida y el diseño racional (Galanie *et al.*, 2020), con el objetivo de mejorar propiedades específicas que permitan su utilización de manera competitiva con los procesos químicos industriales.

1.3 Ingeniería de proteínas

La aplicación de técnicas como la mutagénesis sitio dirigida ha permitido producir proteínas con sustituciones precisas en uno o más residuos de aminoácidos, e incluso, cambios completos de asas y dominios (Brannigan y Wilkinson, 2002). Esta capacidad de construir de proteínas modificadas a voluntad y analizar sus propiedades posteriormente, se fusionó para dar origen al campo de la ingeniería de proteínas. Desde entonces, esta disciplina ha permitido aprovechar el conocimiento sobre la estructura y función de las proteínas para crear moléculas con características deseadas. Dentro de este campo, se destacan estrategias como el diseño racional y la evolución dirigida de proteínas.

Por un lado, el diseño racional necesita conocimiento estructural de la enzima y del estado de transición de la reacción a catalizar, empleando métodos computacionales para predecir propiedades deseadas antes de realizar sustituciones en los residuos de aminoácido (Korendovych, 2018). Por otro lado, la evolución dirigida imita el proceso darwiniano, construyendo bibliotecas de variantes hasta obtener una enzima con las propiedades deseadas, seleccionada mediante un método de tamizaje de alta eficiencia (Arnold *et al.*, 2001). A pesar de sus diferencias, estas estrategias pueden combinarse en enfoques semi-racionales (Chica *et al.*, 2005), identificando posiciones relevantes y sometiénolas a mutagénesis a saturación o generando librerías de mutantes combinatorias (Reetz *et al.*, 2006).

1.4 Construcción de bibliotecas de mutantes

La construcción de bibliotecas implica realizar múltiples mutaciones en la secuencia de ADN que codifica la proteína y seleccionar aquellas variantes que posean la función de interés o que estén mejoradas. Estos procesos utilizan métodos como la PCR propensa a errores, la mutagénesis sitio-dirigida, la mutagénesis a saturación de sitios específicos y la recombinación aleatoria (Neylon, 2004). Con la mutagénesis a saturación, es posible crear una biblioteca de variantes que contengan los 20 posibles aminoácidos en una o más posiciones, mientras que la mutagénesis sitio-dirigida (bibliotecas inteligentes) introduce un número limitado de mutaciones precisas (Reikofski y Tao, 1992).

Dado que la construcción de bibliotecas genera una diversidad de variantes con propiedades diversas, es necesario considerar un método de tamizaje que permita la selección de enzimas con las características deseadas. Por lo tanto, es crucial prestar atención a este proceso.

1.5 Tamizaje de bibliotecas de variantes

Dentro de las propiedades modificables en una enzima se encuentran su estabilidad, solubilidad, expresión, especificidad por sustrato e incluso cambios en el mecanismo de reacción. Dependiendo de la propiedad o función deseada, es posible identificarlas mediante un método de tamizaje. Este paso es muy importante, ya que un enfoque inadecuado puede resultar en la no identificación de aquellas variantes con las propiedades deseadas. Para este fin, se han desarrollado diversos métodos de tamizaje, como la detección de absorbancia o fluorescencia en placas de microtitulación (MTPs), tamizaje en placas de agar, detección de células activadas por fluorescencia (FACS) y métodos empleando microfluidos. De estas estrategias, destacan los ensayos en MTPs debido a su fácil adaptabilidad, amplio rango dinámico y simplicidad, aunque el análisis de librerías extensas sólo es viable con la ayuda de la robótica (Zeng *et al.*, 2020).

Los ensayos en MTPs proporcionan información útil, pero suelen ser de los más laboriosos. Por lo general, las variantes enzimáticas se cultivan, expresan y analizan en pozos individuales, adaptando el medio de reacción y el ensayo espectroscópico correspondiente. Si tanto el producto como el sustrato carecen de una propiedad óptica que se pueda monitorear, se pueden derivatizar con alguna sustancia para poder emplear un método colorimétrico o fluorescente que cuantifique ya sea la formación de producto o la desaparición de sustrato. Esto facilita el seguimiento visual de las reacciones enzimáticas o su cuantificación mediante un lector espectrofotométrico de MTPs. Alternativamente, los productos de reacción pueden ser tamizados mediante cromatografía de gases, HPLC y espectrometría de masas, aunque este proceso es complejo y limita el número de variantes que pueden ser analizadas.

1.6 Citocromos P450

Una de las enzimas favoritas en la ingeniería de proteínas es el citocromo P450 (CYP, siglas en inglés de cytochrome P), una superfamilia de monooxigenasas que contienen un grupo hemo en su sitio activo, con más de 300,000 secuencias genéticas descritas y que están presentes en todos los reinos biológicos (Nelson, 2018). El término “P450” proviene de su característico pico espectroscópico a $\lambda=450$ nm, el cual aparece tras la reducción del hierro del hemo al unirse a monóxido de carbono (Omura y Sato, 1964). Estas enzimas participan en la biosíntesis de esteroides, alcaloides, flavonoides y vitaminas, en el metabolismo de xenobióticos y en los procesos de detoxificación (Zhan y Li, 2017). Su reacción distintiva consiste en la inserción de un átomo de oxígeno en un enlace carbono-hidrógeno (R-H), generando un producto hidroxilado (R-OH) y agua (H₂O). Para ello, requieren de oxígeno molecular (O₂) y dos electrones suministrados a través de moléculas de NAD(P)H (Ec. 1).



Según la configuración de los componentes proteicos involucrados en la transferencia de electrones, los citocromos P450 pueden ser clasificados en hasta diez clases distintas (Hanneman et al., 2007). De estas clases, se resaltan las diferencias entre la clase I, II y VIII (ver *Figura 1*). El sistema de clase I constan de tres proteínas separadas: una reductasa que contiene FAD, encargada de transferir electrones al segundo componente del sistema, una ferredoxina, la cual reduce al propio citocromo P450. En bacterias, estas tres proteínas son solubles; mientras que en eucariotas, únicamente la ferredoxina es soluble. Por otro lado, el sistema de clase II, común en eucariotas, se localiza en el retículo endoplasmático (RE) y está compuesto por dos proteínas integrales de membrana: el citocromo P450 y la NADPH-citocromo P450 reductasa (CPR), que contiene los grupos prostéticos FAD y FMN. Por último, la clase VIII incluye citocromos P450 fusionados con su par reductasa de tipo eucariota, la CPR, en una única cadena polipeptídica, lo que les permite ser catalíticamente autosuficientes como monooxigenasas, un ejemplo de esto es el P450BM3 estudiado en este proyecto.

1.7 Citocromo P450 de *Bacillus megaterium* (P450_{BM3})

Dentro de la familia de los CYPs destaca el de *Bacillus megaterium* (CYP102A1), compuesto por 1,049 aminoácidos que de forma natural cataliza la oxidación en sitios subterminales de ácidos grasos de 12 a 20 carbonos (Narhi y Fulco, 1986). El P450_{BM3} es una enzima autosuficiente debido a la fusión y expresión en un único polipéptido con un dominio catalítico (dominio hemo), y un dominio reductasa (CPR), lo que le permite ser el CYP con la mayor actividad catalítica ($17,100 \text{ min}^{-1}$) cuando utiliza ácido araquidónico como sustrato (Noble *et al.*, 1999). Además, se ha descrito que el P450_{BM3} hidroxila sustratos como alcanos, fenoles y esteroides, además de que pueden catalizar reacciones de epoxidación, desalquilación, desaminación y peroxidación (Whitehouse, 2012). De forma activa, el P450_{BM3} se presenta como dímero, en donde cada monómero interactúa durante la catálisis, permitiendo el transporte de electrones hacia el sitio activo mediante el movimiento de bisagra del dominio reductasa (ver *Figura 2A*).

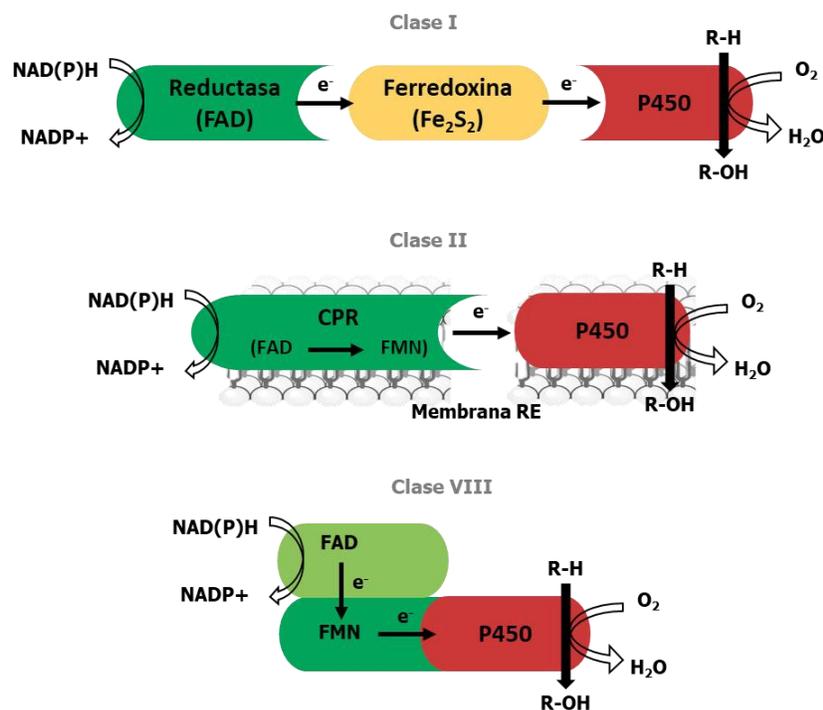


Figura 1. Citocromo P450 en los sistemas de clase I, II y VIII.

Se representa esquemáticamente los sistemas de clase I, II y VIII de los citocromos P450 según la configuración de los componentes proteicos involucrados en la transferencia de electrones.

A pesar de que no se ha logrado cristalizar la estructura dimérica del P450BM3, se han depositado más de 100 estructuras cristalográficas en el PDB ya sea del dominio hemo o fusionado a un dominio FAD. Por ejemplo, para estudios de acoplamiento molecular, se utiliza como referencia la estructura 1BU7, que corresponde a un dímero del dominio hemo P450BM3 WT sin ligando (ver **Figura 2B**). La disponibilidad de estructuras cristalográficas del dominio hemo del P450_{BM3} en presencia o ausencia de diferentes sustratos, ha permitido la exploración de su relación estructura-función, logrando expandir su repertorio de reacciones y sustratos y obteniendo compuestos de interés biotecnológico (Acevedo-Rocha *et al.*, 2018).

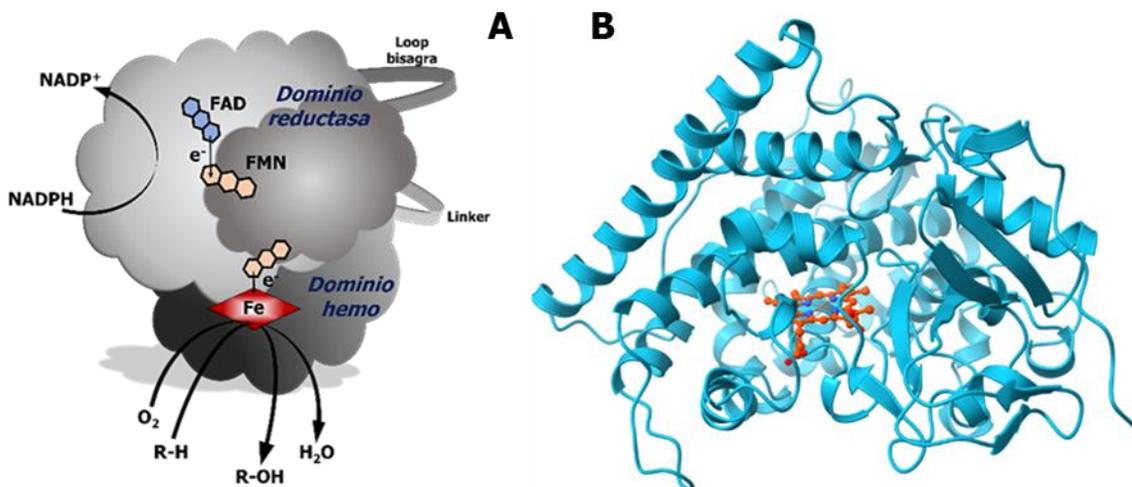


Figura 2. Representaciones del P450BM3. **(A)** El ciclo catalítico del P450BM3 en una estructura monomérica. **(B)** Modelo de cintas del P450BM3, el grupo hemo está resaltado en rojo; la imagen corresponde solo al dominio hemo, PDB: 1BU7.

2. ANTECEDENTES

Se han explorado varios enfoques de ingeniería de proteínas para modificar la especificidad del P450_{BM3}. Por ejemplo, Meinhold y colaboradores emplearon la evolución dirigida para alterar su especificidad, logrando hidroxilar alcanos con un 52% de regioselectividad en la posición terminal (Meinhold *et al.*, 2006). Además, se ha investigado el uso de moléculas señuelo que imitan al sustrato natural, con el propósito de hidroxilar sustratos aromáticos como el benceno y pequeños alcanos como el propano (Shoji *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2014). Otros enfoques han posibilitado que esta enzima catalice reacciones no naturales, como la transferencia de carbenos (Coelho *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014), nitrenos (Brandenberg *et al.*, 2019) y la hidroxilación selectiva de enlaces Si-H (Bähr *et al.*, 2020).

Los análisis estructurales del P450_{BM3} han caracterizado al canal de acceso al sustrato como un canal largo que conecta la superficie de la proteína con el bolsillo catalítico, donde se encuentra el grupo hemo (ver *Figura 3*). En este canal, algunos residuos como el L75, V78, L188 y M354 extienden sus cadenas laterales hacia este espacio (ver *Figura 3B, D*), proporcionando múltiples objetivos para mutagénesis, mientras que residuos como el P25, R47 y Y51, que se ubican en la entrada del sitio catalítico, se han relacionado con el reconocimiento de los ácidos grasos (Ahmed *et al.*, 1999). De manera paralela, mediante simulaciones de acoplamiento molecular del P450_{BM3}, se ha demostrado que los residuos dentro del sitio activo como el F87 y A328 (ver *Figura 3C*) causan cambios en la regioselectividad, es decir, que se favorecen la formación de un enlace sobre un átomo específico y determinan la obtención de un producto mayoritario, mediante la estabilización del sustrato en diferentes conformaciones de unión (Branco *et al.*, 2008).

En conjunto, el análisis estructural y el progreso en ingeniería de proteínas han facilitado la generación de numerosas variantes con cambios de especificidad hacia sustratos como el indol (Li *et al.*, 2000), propranolol (Otey *et al.*, 2006), alcoxiresulfuros fluorógenos (Lussenburg *et al.*, 2005), terpenos (Seifert *et al.*, 2009). También, se destacan las variantes P450_{BM3}-A328V, que permite hidroxilar hexano y octano, para obtener sus correspondientes alcoholes (Peters *et al.*, 2003), y la mutante F87A, que hidroxila ácidos grasos de cadena corta y compuestos bencílicos como el *o*-xileno (Whitehouse *et al.*, 2011).

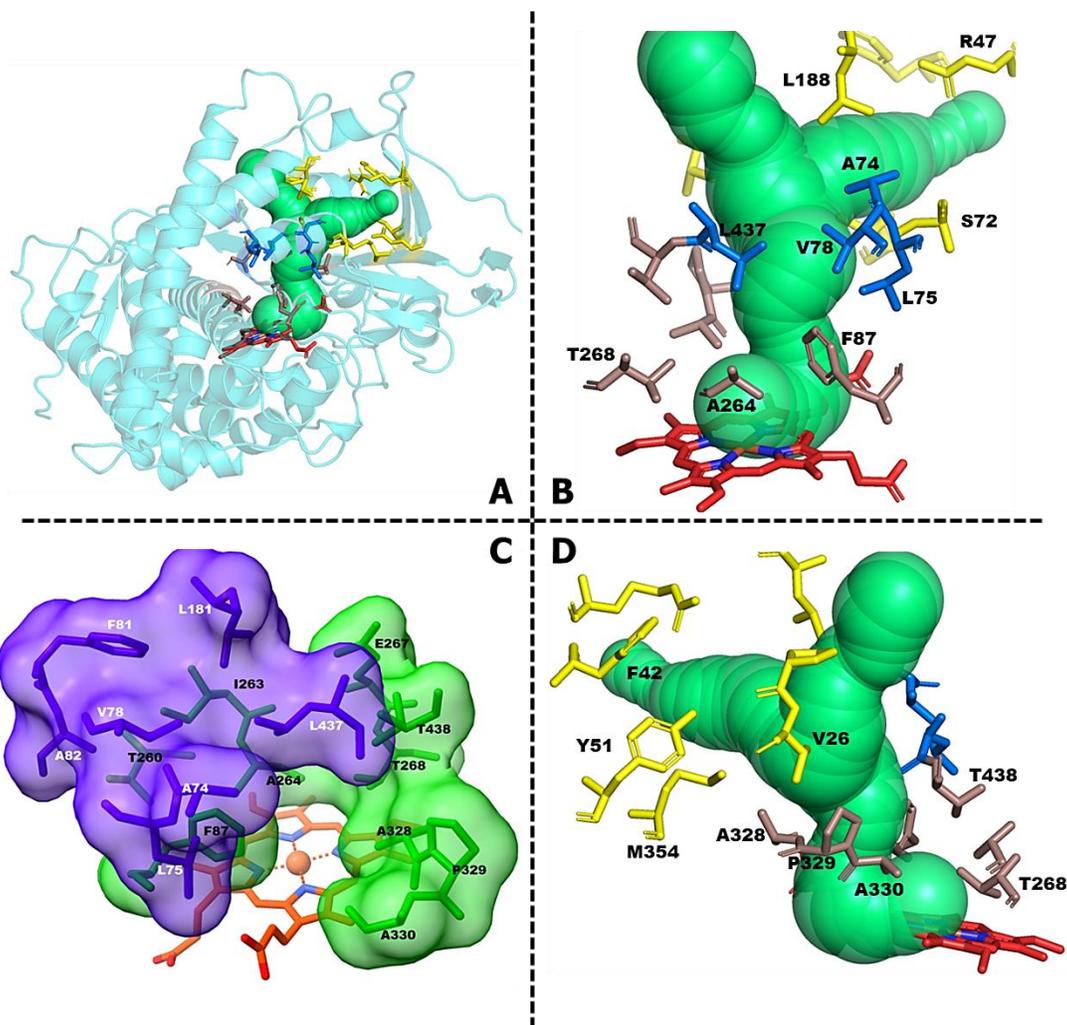


Figura 3. Canal de acceso al sustrato y sitio activo del P450_{BM3}. (A) Localización del canal de acceso al sustrato (verde) en el dominio hemo del P450_{BM3}, PDB ID: 1BU7. (B) y (D) Vista frontal y posterior de los residuos de aminoácido que modulan el canal de acceso. En amarillo, residuos localizados en la entrada; en azul, residuos intermedios; en café, residuos al final del canal y cercanos al sitio activo. (C) Residuos del en sitio activo. En verde, residuos que rodean al grupo hemo; en azul, residuos en la parte superior. El grupo hemo se encuentra en color rojo.

En cuanto a la generación de variantes mediante mutagénesis aleatoria, se ha logrado obtener ejemplos destacados, como la P450_{BM3}(R47L/Y51F/A264G) con la capacidad de hidroxilar compuestos como el fluoranteno con $k_{cat} > 100 \text{ min}^{-1}$ (Li *et al.*, 2001).

Además de las estrategias de mutagénesis aleatoria o sitio-dirigida, se ha investigado en enfoques alternativos, como la utilización de moléculas señuelo. En este sentido, se ha demostrado que el P450_{BM3} es capaz de oxidar moléculas simples como el benceno sin necesidad de mutar el gen, empleando ácidos perfluorocarboxílicos de cadena larga como

moléculas señuelo (Shoji *et al.*, 2013). Estas moléculas, inertes, llenan parte del sitio activo, restringiendo la entrada de los sustratos y permitiendo una interacción más cercana al hemo de lo que sería posible sin ellas (Munday *et al.*, 2016).

En términos generales, la evolución dirigida ha demostrado ser una estrategia sumamente efectiva para identificar aminoácidos necesarios para lograr cambios significativos en la función y la especificidad del P450_{BM3} (Fasan *et al.*, 2008). Sin embargo, su éxito depende de la capacidad para explorar grandes bibliotecas de variantes. Por lo tanto, resulta beneficioso limitar la variabilidad en la secuencia a aquellos residuos que se consideren con mayor influencia en definir la especificidad de la proteína.

Mientras tanto, se han documentado enzimas capaces de hidroxilar al ácido *p*-cumárico, principalmente para la biosíntesis de ácido cafeico. Por ejemplo, un estudio utiliza a las enzimas Tirosina amonio liasa (TAL) y la enzima 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa (4HPA3H), ésta última con la capacidad de hidroxilar ácido *p*-cumárico (Lin *et al.*, 2012), para obtener ácido cafeico (ver **Figura 4A**). Asimismo, dentro de la familia de los citocromos P450, el CYP199A2 de forma natural posee la capacidad de hidroxilar el ácido cinámico y producir ácido *p*-cumárico, pero mediante procesos de evolución dirigida se ha logrado, mediante una segunda hidroxilación, convertir al ácido *p*-cumárico en sustrato y obtener ácido cafeico (ver **Figura 4B**) (Furuya *et al.*, 2012).

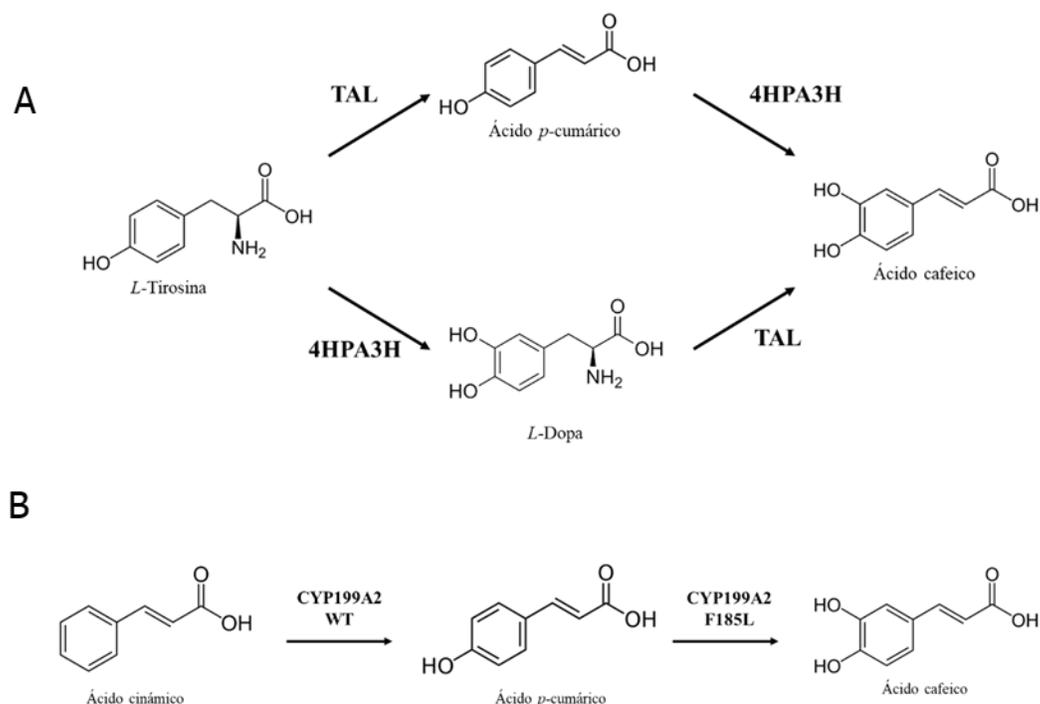


Figura 4. Enzimas que hidroxilan ácido *p*-cumárico.

(A) Vía de síntesis de ácido cafeico en la que participan la enzima Tirosina amonio liasa (TAL) y la 4-hidroxifenilacetato 3-hidroxilasa (4HPA3H), ésta última con la capacidad de hidroxilar ácido *p*-cumárico y *L*-Tirosina. (B) Hidroxilación del ácido cinámico y *p*-cumárico mediante la enzima CYP199A2.

El ácido cafeico se destaca por sus propiedades antioxidantes, lo que lo convierte en un aditivo valioso en diversas industrias, como por ejemplo, su aplicación para prevenir la oxidación de los componentes en formulaciones cosméticas (Sato *et al.*, 2011). Además, se ha evidenciado que posee actividad antiviral y anticancerígena (Gomes *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009). Sin embargo, su obtención presenta desafíos, ya que los métodos tradicionales de extracción a partir de plantas utilizan disolventes y técnicas cromatográficas que resultan en bajos rendimientos (Cheetam y Banister, 2000). Por lo tanto, se siguen explorando alternativas para la producción eficiente de ácido cafeico.

En este contexto, durante su tesis de maestría, Jorge Jiménez Niebla realizó un análisis *in silico* del sitio activo de P450_{BM3}. Este análisis comprendió la implementación de un protocolo de refinamiento, seguido del acoplamiento molecular, utilizando estructuras cristalográficas conocidas: 1BVY, que correspondiente al complejo de dominios hemo y de unión a FMN del P450_{BM3}; 2FR7, que es el cristal del dominio hemo del CYP199A2; 4DNJ,

el dominio hemo del CYP199A2 co-cristalizado con 4-metoxibenzoato y la 1JPZ, que es la estructura del dominio hemo del P450_{BM3} co-cristalizado con N-palmitoilglicina (PDB: 1BVY, 2FR7, 4DJN, 1JPZ; ver **Figura 5, Tabla 1**). Este análisis se complementó con información de variantes ya reportadas, como la 4E10 (Chen *et al.*, 2012), lo que permitió identificar los residuos potencialmente implicados en la interacción con el ácido *p*-cumárico. Se llevó a cabo una comparación de los residuos que ocupan las posiciones equivalentes en citocromos que realizan esta función, como el CYP98A3, parte de la ruta biosintética en plantas (Schoch *et al.*, 2001), y el CYP199A2 de *Rhodospseudomonas palustris*, que se ha demostrado que hidroxila el ácido *p*-cumárico (Furuya *et al.*, 2012). Este último citocromo funciona mediante un sistema de clase I, es decir, depende de otras enzimas para obtener los equivalentes reductores necesarios para el ciclo catalítico.

Durante el análisis, se observó que algunos residuos estaban altamente conservados, mientras que otros mostraron poca contribución en la interacción, lo que permitió delimitar aquellos que desempeñan funciones determinantes para la potencial unión e hidroxilación del ácido *p*-cumárico. De esta manera, se identificaron seis residuos como blancos de mutagénesis combinatoria, y se planteó la propuesta de construir la biblioteca de variantes: R47R/S, F82/A/S/G, F87/A/G/W, A328/F/V, A330/P/T/K y T438/Y/N/L/V. El objetivo es cambiar la especificidad del P450_{BM3} mediante la modificación de la ruta de acceso del ácido *p*-cumárico al sitio activo, así como de favorecer la orientación correcta del anillo aromático cerca del grupo hemo para lograr su hidroxilación.

Tabla 1. Estructuras cristalográficas empleadas en el análisis *in silico*.

PDB ID	Enzima	Descripción	Ligando	Resolución Å	Rfree	Rwork
1BVY	CYP102A1	Dominios hemo y de unión a FMN, del P450 _{BM3}	---	2.03	0.275	---
1JPZ	CYP102A1	Estructura dimérica del dominio hemo del P450 _{BM3}	N-palmitoilglicina	1.65	0.193	0.177
2FR7	CYP199A2	Estructura del dominio hemo del CYP199A2	---	2.01	0.230	0.198
4DNJ	CYP199A2	Estructura del dominio hemo del CYP199A2	4-Metoxibenzoato	1.80	0.205	0.158

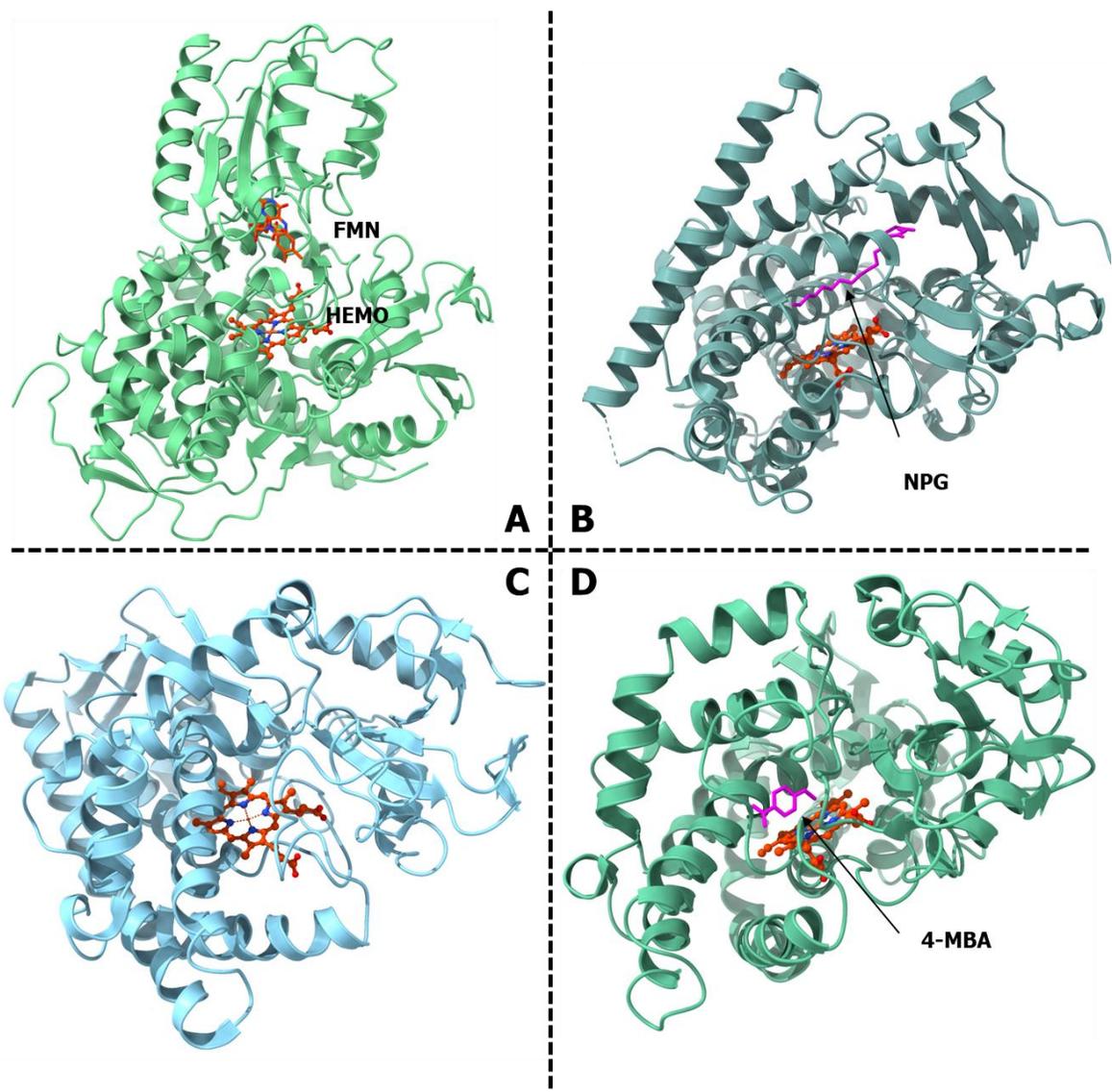


Figura 5. Representación 3D de las estructuras cristalográficas. **(A)** Estructura del dominio hemo y de unión a FMN del P450_{BM3}, PDB: 1BVY. **(B)** Estructura del dominio hemo, co-cristalizado con N-palmitoilglicina (NPG) como ligando, PDB: 1JPZ. **(C)** Estructura del dominio hemo del CYP199A2, PDB: 2FR7 y **(D)** co-cristalizado con 4-Metoxibenzoato (4-MBA), PDB: 4DNJ. En rojo se encuentran los grupos hemo y FMN; en magenta, los ligandos.

3. HIPÓTESIS

La construcción de variantes mediante mutagénesis combinatoria guiada por diseño permitirá modificar la especificidad del citocromo P450_{BM3} para hidroxilar ácido *p*-cumárico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Construir una biblioteca de variantes del citocromo P450_{BM3} mediante mutagénesis combinatoria guiada por diseño y evaluar su capacidad de hidroxilar ácido *p*-cumárico.

4.2 Objetivos particulares

- Establecer un método de tamizaje en formato de alta eficiencia que detecte productos con mayor capacidad antioxidante que el ácido *p*-cumárico.
- Generar una biblioteca de variantes mediante mutagénesis sitio-dirigida en los residuos de aminoácido seleccionados.
- Evaluar la biblioteca de variantes con el método de tamizaje propuesto y validado.
- Caracterizar los productos de reacción obtenidos por variantes seleccionadas de la librería combinatoria.
- Determinar los parámetros cinéticos de la(s) variante(s) seleccionada(s).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos químicos y bioquímicos

BioRad: agarosa; azul de bromofenol, azul de xilencianol. J.T.Baker: ácido fórmico, carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de magnesio hexahidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloroformo, dodecil sulfato de sodio (SDS), fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), glicerol, ferrozina, metanol. Fermont: ácido clorhídrico. Gibco: extracto de levadura, triptona. Sigma: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ampicilina, azul brillante de Coomassie, cloruro de hierro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), NADPH, 2-mercaptoetanol, imidazol, kanamicina, membranas de celulosa para diálisis, reactivo de Folin, reactivo TEMED, sulfato de níquel hexahidratado. Thermo scientific: IPTG.

5.2 Reactivos biológicos

New England Biolabs: Enzimas de restricción NcoI, SacI y XhoI. Thermo Fisher Scientific: T4 DNA ligase. Roche: *High Pure PCR Product Purification Kit* y *High Pure Plasmid Isolation Kit*. Sigma: lisozima, DNAsa I.

Las DNA polimerasas (Taq y PFU) fueron expresadas y purificadas en el laboratorio. Los oligonucleótidos empleados (Tabla 2), así como las secuencias de DNA de las variantes fueron obtenidos por parte de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt-UNAM.

5.3 Cepas y plásmido

Para la construcción de variantes se empleó al plásmido pCWori y como vector de expresión al plásmido pET28a. Se utilizó la cepa de *E. coli* MC1061 (*araD139 Δ(araA-leu)7697 Δ(lac)X74 galK16 galE15(GalS) lambda-e14-mcrA0 relA1 rpsL150(strR) spoT1 mcrB1 hsdR2*) para electrotransformación y la cepa ER2566, derivada de BL21 DE3 (*B F⁻ λ⁻ fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7.1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10)(Tet^S)2 R(zgb-210::Tn10)(Tet^S) endA1 [dcm]*) para la sobreexpresión de la biblioteca de variantes.

5.4 Preparación de células electrocompetentes

A partir de un cultivo overnight de *E. coli* MC1061 y la posterior inoculación y crecimiento a saturación en 1 L de medio de cultivo LB suplementado con estreptomicina, se obtuvo una suspensión bacteriana que fue centrifugada a 4500 RPM por 20 min. Enseguida, la pastilla celular se lavó en tres ocasiones (mediante resuspensión, manteniendo todas las soluciones en hielo): primero con 1 L de agua destilada estéril, posteriormente con 0.5 L de glicerol al 10% estéril, este paso se repitió con 250 mL. Después de cada resuspensión, la fracción celular se mantuvo en hielo durante 5 min y se separó mediante centrifugación (4,500 RPM, 20 min, 4°C). La pastilla celular se resuspendió en 1 mL de medio 2 X GYT al 50% con glicerol al 10% estéril. Finalmente, se alicuotaron fracciones de 50 µL de células, se congelaron sobre hielo seco y fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

5.5 Preparación de células quimiocompetentes

La fracción celular de una suspensión bacteriana (1mL a 0.5-0.6DO₆₀₀) se separó mediante centrifugación (13,000 x g, 2 min). Enseguida, la pastilla celular se lavó en dos ocasiones (mediante resuspensión, manteniendo todas las soluciones en hielo): primero en 0.5 mL de agua destilada estéril, posteriormente en 0.5 mL de CaCl₂ 100 mM estéril. Después de cada resuspensión, la fracción celular se mantuvo en hielo durante 5 min y se separó mediante centrifugación (2,000 x g, 5 min, 10°C). Finalmente, la pastilla se resuspendió en 0.05 mL de CaCl₂ 100 mM estéril y se mantuvo durante 5 min en hielo.

5.6 Transformación y selección bacteriana

Transformación por electroporación: el producto de ligación desalinizado y resuspendido en 2 µL de ddH₂O se transfirió a 50 µL de células electrocompetentes y se incubó 60 s en hielo, después se transfirió a una celda fría de 0.1 cm para electroporación, se dio un pulso eléctrico a una constante de tiempo de 4 a 5 ms de 25Uf, 1.8 kV y 200 ohm de resistencia con ayuda de un electroporador (MicroPulser, BioRad). Posteriormente se transfirió a 1 mL de medio SOC y se incubó por 40 min a 37°C. La suspensión se decantó en placas de agar con medio LB sólido suplementado con antibiótico. Se incubó a 37 °C por una noche para la obtención de colonias transformantes.

Transformación por choque térmico: de 50-100 ng de DNA se añadieron a 50 μ L de células quimiocompetentes, se incubaron 30 min en hielo, seguido de 30 s a 42°C, finalmente 5 min en hielo. Posteriormente, se transfirió a 1 mL de medio LB precalentado y se incubó por 1 h a 37°C y 250 RPM. La suspensión se plateó en medio LB sólido suplementado con antibiótico. Se incubó a 37°C por una noche para la obtención de colonias transformantes.

5.7 Ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) para contenido de fenoles totales

El reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C) se diluyó en una proporción 1:4 (v/v) con agua destilada y se mantuvo protegido de la luz y refrigerado hasta su uso. Se preparó una solución de Na_2CO_3 al 7.5% en agua destilada. La reacción colorimétrica se realizó adicionando 50 μ L del reactivo diluido de F-C a los 20 μ L obtenidos del ensayo de actividad. La mezcla se dejó en reposo durante 8 min, protegido de la luz, luego se agregaron 50 μ L de la solución de Na_2CO_3 y se aforó a 200 μ L con ddH₂O. Esta mezcla se mantuvo en reposo durante 2 horas en ausencia de la luz antes de medir Abs a $\lambda=765\text{nm}$ (adaptado de Ainsworth y Gillespie, 2007).

5.8 Ensayo férrico-ferrozina para la capacidad antioxidante total

Se pesó la cantidad adecuada de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para lograr una concentración final de Fe(III) en solución de 2×10^{-3} M. Luego, se añadió 1 mL de solución de HCl 1 M y se mezcló con una solución previamente preparada que contenía 0.123g de ferrozina (FZ) en ddH₂O. La mezcla se diluyó a 25 mL para que la concentración final de ferrozina fuera de 1×10^{-2} M. Esta solución se empleó inmediatamente ya que la estabilidad del complejo Fe(III)-FZ es menor a un día aun cuando se conserva en recipiente hermético y protegido de la luz solar. La reacción colorimétrica se realizó adicionando 200 μ L del complejo Fe(III)-FZ a 20 μ L de la muestra del ensayo de actividad, dejando en reposo 30 min antes de medir Abs a $\lambda=562$ nm (Adaptado de Berker *et al.*, 2010). De manera cualitativa, el cambio de tonalidad de rosa a morado se observa con relación a la capacidad antioxidante de los compuestos presentes.

5.9 Construcción de la biblioteca de variantes

La biblioteca de variantes se construyó mutagenizando los sitios 47, 82, 87, 328, 330 y 438 mediante el protocolo de *megaprimer PCR* (adaptado de Forloni *et al.*, 2019), empleando los oligonucleótidos de la **Tabla 2** y como templado al plásmido pCWori que contiene el gen del P450_{BM3} variante 4E10 (A82L y A328V) que hidroxila alcanos como el propano y etano (Chen *et al.*, 2012).

Tabla 2. Oligonucleótidos para la construcción de la biblioteca.

Nombre del oligo	Mutación introducida	Secuencia (5'>3')*
R47 rv	R S	AGCGCGTTAC <u>SCT</u> ACCAGGCGCC
F87 rv	A82/A/S/G F87/F/A/G/W	CCAGCTTGTS <u>SVMTA</u> ACCCGTCTCCTRMAAAATCACG
A328/A330 rv	A328/A/FV A330/A/P/T/K	AGGGAAAAT <u>TKB</u> AGGGRMAGTTGGCC
T438	T438T/Y/N/L/V	AACTACGAGCTCGATATTAAGAACTTTADH <u>STT</u> AAAACCTG
S566 rv	---	ACGGMGTAGCGAACGCCTTTTAC
NcoI Fw	---	TCTATCCATGGCAATTAAGAAATGCCTC
XhoI Rv	---	TCGATCTCGAGATCCCCAGCCCACACGTC

*Los nucleótidos mutagénicos se encuentran subrayados. Código de una letra para bases degeneradas: **M**=A/C, **R**=A/G, **S**=C/G, **K**=G/T, **V**=A/C/G, **D**=A/G/T, **H**=A/T/C, **B**=C/G/T.

Las reacciones de PCR se realizaron conforme a la región a mutagenizar, empleando las mezclas de reacción y condiciones de amplificación que se muestran en el Anexo 1.

5.10 Clonación de las librerías

Se realizaron reacciones de digestión de DNA con las endonucleasas SacI y XhoI cuando se trató del fragmento de PCR con la región que codifica para el dominio reductasa, con las mutaciones en 438. Por otra parte, las reacciones de digestión con las endonucleasas NcoI y SacI fueron con el fragmento de PCR que contuvo la región que codifica para el dominio hemo, con las mutaciones en 47, 82, 87, 328 y 330.

Los productos digeridos se ligaron utilizando la T4 DNA ligasa en una reacción a 16°C por 12 horas, utilizando como vector al pET28a. El producto de ligación fue desalinizado mediante precipitación con butanol y etanol previo a la transformación por electroporación en células MC1061 de *E. coli*.

5.11 PCR de colonias

Las colonias fueron resuspendidas en 14 μ L de ddH₂O. Las células se lisaron en un termociclador aplicando 65°C durante 30s, 8°C durante 30s, 97°C durante 3 min, 8°C durante 1 min y 65°C durante 3 min. Posteriormente, se agregaron 6 μ L de mezcla de reacción que contenía buffer de Taq, dNTPs, Taq polimerasa y oligos (A330Fw y 566Rv). La PCR se realizó tomando como referencia las condiciones del anexo 2 para un fragmento específico.

5.12 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Las muestras de ADN se mezclaron 5:1 con buffer de carga 6X (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de azul de xilencianol, 30% de glicerol). Una alícuota de 3 μ L de cada muestra se cargó en un gel al 1% de agarosa suplementado con bromuro de etidio. La separación electroforética de fragmentos de ADN se realizó a 100V por \approx 30 min. El gel se visualizó usando un fotodocumentador Gel DocTM EZ Imager (BioRad).

5.13 Cultivo y expresión de variantes del P450_{BM3} en formato de cajas de 96 pozos

Colonias individuales de *E. coli* ER2566 o BL21 transformadas con la librería de variantes o con el P450_{BM3} WT fueron inoculadas en cajas de cultivo de 96 pozos de 1 mL que contenían medio LB (Km⁺) y se incubaron a 37°C y 250 RPM por 12 h. Estas cajas sirvieron de preinóculo y de memoria para preservar las diferentes clonas. Con 50 μ L de precultivo se inocularon 900 μ L de medio TB (Km⁺) en cajas nuevas. Después de 4.5 h de incubación a 37°C, cuando se alcanzó una DO₆₀₀ de \approx 0.6, se indujo la sobreexpresión de proteína adicionando 50 μ L de medio TB con IPTG 5 mM (C_f = 0.25 mM), la temperatura de incubación se cambió a 30°C y se mantuvo hasta 24 h post-inducción. Posteriormente, las cajas se centrifugaron durante 30 min a 3500 RPM y 4°C, descartando el sobrenadante. El pellet celular se congeló a -20°C al menos 8 h y entonces fue resuspendido en 500 μ L de buffer KPi (100 mM, pH 8) que contenía lisozima (0.5mg/mL), DNAsa I (0.1mg/mL) y MgCl₂ (10mM) e incubado 1 h a 37°C con agitación. En seguida, las cajas se centrifugaron 10 min a 1500g y 4°C para obtener el sobrenadante con lisado celular, el cual se empleó para los ensayos de actividad y el proceso de tamizaje (ver **Figura 6**. Ronda de tamizaje de variantes en formato de MTPs.).

5.14 Consumo de NADPH a $\lambda=340$ nm y tamizaje de variantes

En MTPs de 96 pozos de fondo transparente, se transfirieron 30 μ L del lisado celular proveniente de cada clona y se agregaron 120 μ L de buffer KPi (100mM, pH 8) que contenía ácido *p*-cumárico 0.8 mM (resultando en una concentración final de 0.4 mM). Tras 5 min de incubación con el sustrato, la reacción se inició adicionando 50 μ L de NADPH 2.8 mM (concentración final 0.7 mM). Un MTP sirvió de control sin adicionar sustrato para determinar la señal de fondo del NADPH. Luego de la adición de NADPH, se monitoreó su oxidación a $\lambda=340$ nm durante 15 min (a intervalos de 12s) utilizando el lector de MTPs Tecan Saphire II.

Para el tamizaje de las variantes, las reacciones anteriores se dejaron incubando a temperatura ambiente y en ausencia de la luz durante un máximo de 12 h. Después este periodo, se tomaron 20 μ L de cada pozo y se analizaron conforme al ensayo de Fe(III)-FZ.

5.15 SDS-PAGE

La expresión y purificación de variantes se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). El gel de separación contenía 2 mL de ddH₂O, 1.65 mL de mezcla de acrilamida al 30 %, 1.25 mL de Tris 1.5 M (pH 8.8) con 0.05 mL de SDS al 10 %, 75 μ L de persulfato de amonio (APS) al 10% y 7.5 μ L de TEMED. El gel de apilamiento constaba de 1.5 mL de ddH₂O, 0.375 mL de mezcla de acrilamida al 30%, 0.625 mL de Tris 1 M (pH 6.8), 0.01 mL de SDS al 10%, 50 μ L de APS al 10 % y 5 μ L de TEMED. Las muestras de proteína se mezclaron 4:1 con un buffer de carga 4x (Tris-HCl 62.5 mM con pH 6.8, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.002%, glicerol al 10%) y se incubaron a 90°C durante 5 min. Después de centrifugar (2 min, 9000 g), se cargaron de 10 μ L de muestra en el gel y 2 μ L de marcador de proteína (11 a 245 kDa, NEB). La electroforesis en gel se llevó a cabo a 25 mA durante 90 min con buffer de corrida (0.3% Tris, 1.5% glicina, 0.1% SDS en ddH₂O). Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie (0.05% de coomassie, 50% de metanol, 10% de ácido acético, en ddH₂O) y se destiñeron con una solución decolorante (40% de etanol, 10 % de ácido acético en ddH₂O).

5.16 Ensayo por cromatografía en capa fina (TLC)

Se tomaron 200 μL provenientes del ensayo de actividad y se transfirieron inmediatamente a un tubo eppendorf de 1.5 mL para evitar la oxidación de los productos de reacción. Se adicionaron 50 μL de HCl 0.1M para obtener solo especies protonadas que puedan migrar correctamente. La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en placas de UV-silica (silica gel 60 F₂₅₄, Merck KGaA). Se aplicaron 5 μL de la muestra de reacción y se utilizó como fase móvil una mezcla de cloroformo: metanol: ácido fórmico (85:15:1) para favorecer el desplazamiento de los productos de la reacción. Se incluyeron controles de ácido *p*-cumárico y ácido cafeico. Los productos de reacción y controles fueron visualizados mediante exposición a luz UV.

5.17 Expresión y purificación de variantes de P450_{BM3}

El DNA plasmídico de las variantes se transformó por choque térmico en *E. coli*. Se realizó un cultivo nocturno en medio LB (K^{m^+}) de cada variante y fue empleado para inocular 100 mL de medio TB (K^{m^+}). Las células se cultivaron a 37°C y 200 RPM hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.6$, momento en el que se adicionó IPTG (0.25 mM) y se cambió la temperatura de incubación a 30°C por 12 h más. Los cultivos fueron centrifugados a 6000 RPM por 20 min. Los pellet celulares se resuspendieron en buffer KPi (50 mM, pH 8) más 300 mM NaCl y se lisaron por sonicación (10 pulsos de 50% de intensidad por 20 s, dejando enfriar por 120s; sonicador Branson 450). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 8000 RPM durante 30 min y a 4°C. Enseguida, el sobrenadante se filtró en una membrana de 0.22 μm antes de la purificación por cromatografía de afinidad a His-tag mediante FPLC o por gravedad en una columna de agarosa- Ni^{2+} , en el cual se eluyó con imidazol de 350 mM en buffer KPi (50 mM, pH 8) y 300 mM NaCl. Las eluciones se recolectaron y fueron analizadas por SDS-PAGE. Las fracciones con la proteína pura se dializaron en membranas de celulosa con corte de 14 kDa por 12 h y 4°C con agitación constante en buffer KPi (50 mM, pH 8) y NaCl 300 mM. Se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford y se corroboró por absorbancia mediante espectroscopia.

5.18 Espectro absoluto de las proteínas purificadas

El espectro se obtuvo mediante un barrido en la región de 250 a 700 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Vis Beckman Coulter DU 730, empleando celdas de cuarzo de 1 cm. Las proteínas purificadas se diluyeron 20 veces en buffer KPi 100 mM pH 8, siendo este último utilizado como blanco de absorción. Se prestó atención a la absorbancia en 418 nm para detectar la banda Soret característica de los citocromos P450 en estado de bajo spin y ausencia de sustrato. Se calculó el factor $Rz = A_{418\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ como indicador del grado de pureza de la proteína con hemo. Las concentraciones de hemo activo se determinaron utilizando $A_{418\text{ nm}}$ y se calcularon aplicando la ecuación de Lambert-Beer con un coeficiente de extinción de $\epsilon_{418} = 105\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

5.19 Diferencia espectral de unión a sustratos

Se preparó una solución del P450_{BM3}WT y sus variantes en buffer KPi 100mM, pH 8 a una concentración de al menos 1 μM . A cada proteína se le añadieron SDS y ácido *p*-cumárico a un concentración de 0.4 mM, dejando reaccionar durante 1 hora a 300 rpm y a 25°C. Luego, se registraron los espectros de absorción en la región de 390 nm a 418 nm para evaluar los cambios espectrales en presencia y ausencia de sustratos. La diferencia espectral se calculó restando la absorbancia en ausencia de sustrato de la absorbancia en presencia de sustrato.

5.20 Modelado molecular del P450_{BM3}

Para el acoplamiento molecular se empleó AutoDock 4, utilizando la estructura del P450_{BM3} WT (PDB: 1BU7). Los cambios en aminoácidos simulados fueron con la función de rotámeros de UCSF Chimera. Las moléculas de agua cristalina fueron eliminadas, excepto la que está unida al hierro en el dominio hemo. Las estructuras de P450_{BM3} WT y sus variantes se rotamerizaron y se minimizó la energía para corregir residuos con ángulos de torsión no estándar. Se definió un grid de 12 Å alrededor del hierro del hemo. Las cadenas laterales de los residuos vecinos dentro de 5 Å de la molécula de agua unida se trataron de manera flexible. Se llevaron a cabo 100 ejecuciones de acoplamiento y se agruparon aplicando un límite de RMSD de 0,5 Å y con la mejor energía de unión.

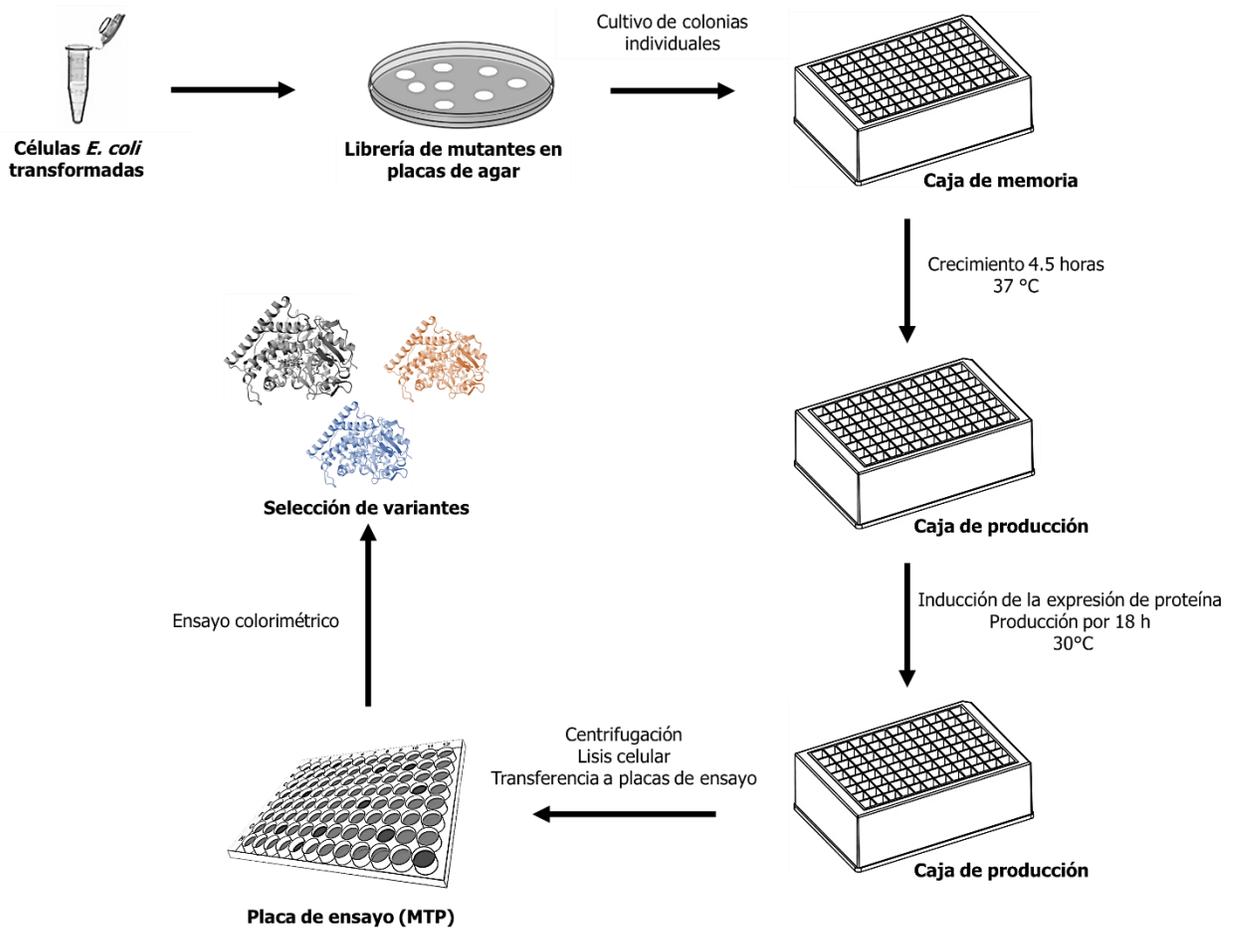


Figura 6. Ronda de tamizaje de variantes en formato de MTPs. Se muestra el proceso general del tamizaje de variantes que inicia desde la transformación de la librería hasta la selección de variantes mediante el método de Fe(III)-FZ.

5.21 Estrategia experimental

5.21.1 Determinación de un método de tamizaje en formato de alta eficiencia

La identificación de las variantes del P450_{BM3} con la capacidad de hidroxilar al ácido *p*-cumárico y por lo tanto producir un compuesto hidroxilado como el ácido cafeico, requirió de la implementación de un método de tamizaje. Para ello, se compararon dos ensayos colorimétricos basándose en las características químicas del sustrato y del producto, los cuales fueron: el ensayo Fe(III)-FZ que evalúa la capacidad antioxidante (sección 5.8) y el ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) que determina el contenido de compuestos fenólicos totales (sección 5.7).

Con la finalidad de adaptar los ensayos a volúmenes de ≈ 200 μ L en un formato de placas de microtitulación de 96 pozos (MTPs), se simuló el proceso de expresión del P450_{BM3} (sección 5.13) para obtener lisado celular. También se simuló el proceso de la sección 5.14, ya que las reacciones se realizan en presencia de sustrato y NADPH. Para evaluar las respuestas colorimétricas de ambos ensayos y determinar la sensibilidad, rango lineal e interferencias de los componentes en la mezcla de reacción, se realizaron una serie de reacciones bajo las condiciones indicadas a continuación:

1. Condiciones estándar (medio acuoso o tamponado, que normalmente manejan los ensayos de Fe(III)-FZ y F-C)
2. Condiciones estándar en presencia de lisado celular
3. Condiciones estándar en presencia de lisado celular y NADPH

Para cada condición de ambos ensayos, las reacciones fueron en formato de serie, en la que se ensayaron concentraciones crecientes de cada compuesto (anexo 2).

- *Serie A.* Concentraciones de 0 a 0.4 mM de ácido *p*-cumárico.
- *Serie B.* Concentraciones de 0 a 0.4 mM de ácido cafeico.
- *Serie C.* Concentraciones decrecientes de ácido *p*-cumárico (de 0.4 a 0 mM) y concentraciones crecientes de ácido cafeico (de 0 a 0.4 mM), simulando la reacción en la que la concentración del producto (ácido cafeico) aumenta como resultado del consumo del sustrato (ácido *p*-cumárico).

Posterior a simular el proceso de la sección 5.14 con las 3 condiciones, se tomaron 20 μ L de cada condición y serie (10 % de muestra) y se depositaron en otro set de MTPs para realizar por separado cada ensayo colorimétrico, mezclando con sus correspondientes reactivos y obteniendo las absorbancias conforme los métodos colorimétricos.

5.21.2 Construcción de la biblioteca de variantes del P450_{BM3}

La biblioteca se construyó siguiendo el protocolo del *megaprimer PCR* (sección 5.9 y anexo 1), que inicialmente consiste en la generación de un fragmento con la mutación deseada y posteriormente emplearlo como megaprimer en una segunda ronda de PCR para amplificar una región más larga de ADN que pueda clonarse en el vector apropiado (ver *Figura 7*). Se adoptó esta estrategia con el objetivo de acumular mutaciones en cada ronda de PCR, manteniendo simultáneamente los codones silvestres, lo que resultó en una biblioteca con combinatoria de variantes. Sin embargo, debido a la disminución de la eficiencia en las reacciones de PCR con este método, se dividió la construcción de las variantes en 4 etapas. Cada una de estas etapas implicó la generación de bibliotecas independientes que sirvieron de respaldo y de templado para las PCR subsiguientes. Cada paso incluyó reacciones de PCR, digestión, ligación, transformación, PCR de colonia, secuenciación y recuperación del banco de ADN plasmídico.

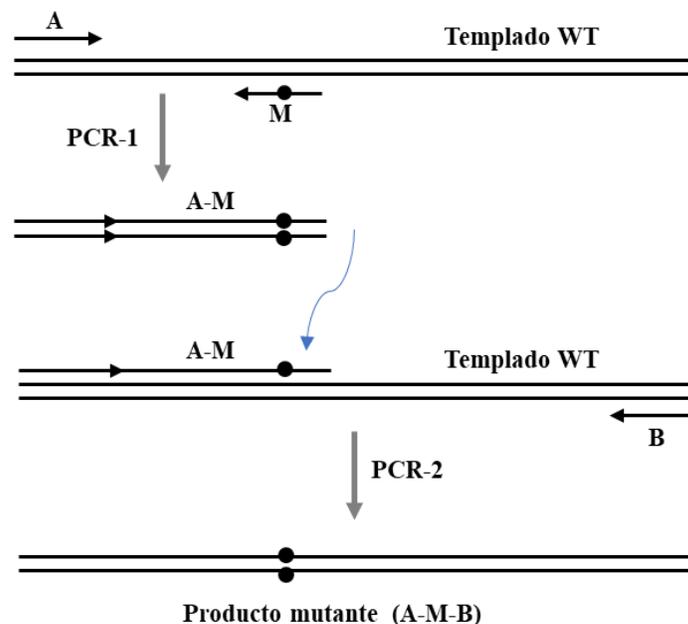


Figura 7. Método de megaprimer.

Se emplean los primers **A** y **B**, que contienen sitios de restricción (p.ej. *NcoI* y *SacI*) y un “clamp” extra en el extremo 5', mientras que el primer **M** es el que introduce las mutaciones. En una segunda PCR, el producto **A-M** se emplea como megaprimer junto con el primer **B** para obtener el producto final (**A-M-B**) que se restringe y clona.

La presencia del gen se confirmó mediante PCR de colonias, empleando un par de oligos que se unen a sitios intermedios de la región codificante hemo y de reductasa. Para su secuenciación, las colonias con PCR positiva se cultivaron en medio LB (Km⁺) para obtener un cultivo y aislar el ADN plasmídico, corroborando por digestión la presencia del gen con un par de enzimas NcoI-SacI o NcoI-XhoI.

El primer paso consistió en mutagenizar la posición 438, que se encuentra después de un sitio de corte SacI. Se utilizó como templado la región reductasa de la variante “Mut M” que contiene mutaciones en 6 posiciones que le confieren mayor termoestabilidad que la silvestre (Saab-Rincón *et al.*, 2018). Confirmadas las mutaciones, se recuperaron todas las colonias transformantes para la extracción del ADN plasmídico que contenía la librería de variantes sobre esta posición. El respaldo de esta librería se resuspendió en glicerol/LB (1:1) y se conservó a -70°C.

En el segundo paso, se mutagenizaron las posiciones 47, 82 y 87, obteniendo un fragmento que fue clonado y del cual se generó un ADN plasmídico que se utilizó como templado para el tercer paso, en el que se adicionaron las mutaciones en 328 y 330 (sección 5.9 y anexo 1). De la misma manera, se guardó un respaldo de células en glicerol/LB (1:1) a -70°C. Finalmente, teniendo un ADN plasmídico con variabilidad en 47, 82, 87, 328 y 330; y otro con variabilidad en 438, se completó la librería fusionando mediante digestión y ligación ambas regiones en un solo banco de ADN.

El ADN plasmídico de la biblioteca completa fue aislado y transformado en células de *E. coli* BL21 para la expresión de las variantes conforme a la sección 5.13 y continuar con el proceso de tamizaje empleando el método establecido.

Durante la construcción de la biblioteca de variantes, se contabilizó el número de colonias transformantes en cada proceso para verificar que se obtuviera de forma representativa la variabilidad conforme a la combinación de nucleótidos. En algunos casos no se continuó con el proceso siguiente hasta haber obtenido un número adecuado de colonias transformantes. El proceso en general puede ser visualizado en la **Figura 8**)

5.21.3 Tamizaje de la biblioteca y selección de variantes del P450_{BM3}

Una vez construido el banco de ADN plasmídico con la biblioteca de variantes, se procedió con el tamizaje en busca de variantes capaces de hidroxilar el ácido *p*-cumárico.

En primer lugar, se aseguró que el protocolo a seguir (sección 5.13) permitiera obtener un lisado celular con presencia del citocromo P450_{BM3} y que mostrara actividad detectable mediante consumo de NADPH, principalmente porque la expresión de proteína se produce en volúmenes no mayores a 1 mL de medio de cultivo y la obtención del lisado celular es a través de lisis enzimática, un método poco eficiente para romper células comparado con la sonicación.

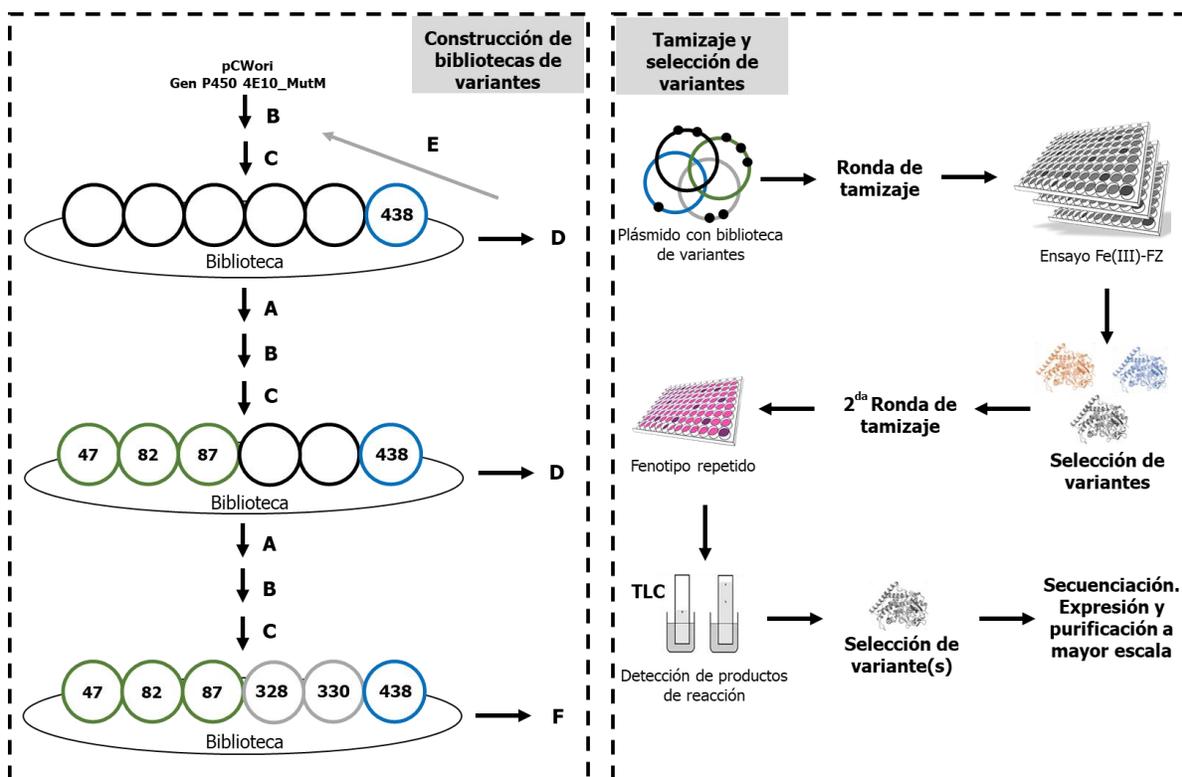


Figura 8. Construcción de bibliotecas y selección de variantes.

Se presenta un esquema general de los procesos involucrados en la construcción de la biblioteca, el tamizaje y selección de variantes. (A) Aislamiento del plásmido de las colonias transformantes. (B) Empleo del método de megaprimer. (C) Clonación del gen mutado y su posterior transformación en *E. coli*. (D) Evaluación de la eficiencia de transformación (p. ej. garantizando que el número de colonias sea al menos 3 veces mayor que la variabilidad esperada) y secuenciación del banco. (E) Baja eficiencia de transformación, se repite el proceso.

(F) Aislamiento del plásmido con la biblioteca completa, para su tamizaje.

Establecidas las condiciones de trabajo, el tamizaje de variantes se realizó empleando el ensayo de Fe(III)-FZ. Durante este proceso, se obtuvieron los datos de absorbancia de cada lote de variantes, así como de un número de pozos destinados a P450_{BM3} WT como control y se construyó una curva estándar con ácido cafeico en concentraciones que iban de 0 a 0.4 mM. Como criterio de selección, se estableció que las variantes con valores de absorbancia superiores al promedio más 1 desviación estándar obtenido del P450_{BM3} WT serían seleccionadas. Las variantes seleccionadas se sometieron a un segundo proceso de tamizaje para confirmar el fenotipo mostrado y descartar falsos positivos.

Seleccionada una variante que mostró consistentemente el fenotipo deseado, se llevó a cabo un análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) para detectar la formación de productos que pudieran estar influyendo en el ensayo colorimétrico. Para ello, se probaron diferentes proporciones de disolventes orgánicos (tolueno, acetato de etilo, metanol, cloroformo, ácido acético, ácido fórmico) y se determinó que una mezcla de cloroformo, metanol y ácido fórmico en una proporción 85:15:1 proporciona la mejor separación de los compuestos. Dado que tanto el ácido *p*-cumárico como el ácido cafeico son compuestos aromáticos, la TLC se visualizó en placas de sílica-gel mediante exposición a la luz UV.

Finalmente, obteniendo una variante o variantes que mostraran un producto de reacción en la TLC, se aisló el ADN plasmídico para determinar los cambios en la secuencia. Además, se procedió a caracterizar en mayor medida su producto de reacción expresándola y purificándola conforme a la sección 5.17. (ver **Figura 8**).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de un método de tamizaje en formato de alta eficiencia

Uno de los desafíos en la construcción de bibliotecas de variantes radica en identificar aquellas con mejoras en sus características entre el gran número de variantes generadas (Arnold y Georgiou, 2008). Aunque algunos métodos de tamizaje utilizando MTPs se centran en el análisis del consumo de NADPH de las variantes (Glieder y Meinhold, 2003), se suelen identificar algunas con mayor consumo de NADPH, sin embargo, detrás de este consumo puede existir baja eficiencia de acoplamiento y la formación reducida de productos (Morlock *et al.*, 2018). Por lo tanto, una estrategia adecuada implica el uso de métodos colorimétricos o fluorescentes específicos para la formación de productos. En este sentido, se han desarrollado métodos de selección de variantes del P450_{BM3} capaces de detectar productos hidroxilados a partir de compuestos aromáticos o alquenos (Alcalde *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2005). Sin embargo, para los objetivos del presente proyecto se necesitó de un método específico para la cuantificación de ácido cafeico en formato de MTPs, que fuera rápido, simple y reproducible. Para lograrlo, se determinó el mejor método de tamizaje mediante la comparación de la sensibilidad, rango lineal e interferencias en los ensayos propuestos de Fe(III)-FZ y F-C. Los resultados se presentan a continuación.

6.1.1 Ensayo de F-C

Conforme a la estrategia desarrollada (sección 5.21.1), se ensayaron diferentes condiciones tomando en consideración la presencia de lisado celular, NADPH, ácido *p*-cumárico y ácido cafeico.

➤ **Condiciones estándar**

Se realizó una comparación de las respuestas colorimétricas obtenidas en presencia de ácido *p*-cumárico y ácido cafeico en buffer KPi (100 mM, pH 8) y ddH₂O. Cualitativamente, se observó la formación de un color azul en función de la concentración de cada reactivo (**Figura 9**), siendo más pronunciada en la Serie B (cafeico) respecto a la Serie A (cumárico); mientras que, la coloración más intensa se observó en la Serie C.

En el ensayo de F-C existe una transferencia de electrones en medio alcalino de los compuestos fenólicos a complejos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico, lo que resulta en la formación de complejos coloreados que absorben a $\lambda=765$ nm (Singleton *et al.*, 1999). Por consiguiente, la intensidad de la coloración en la Serie C era de esperarse dado que existe la presencia conjunta del ácido *p*-cumárico y del ácido cafeico.

No obstante, dado que el objetivo era determinar la sensibilidad del ensayo y su rango lineal, se registraron las absorbancias a $\lambda=765$ nm en un intervalo de concentraciones de 0 a 0.4 mM de cada compuesto en cada una de las series, que son mostradas en la **Figura 10**.

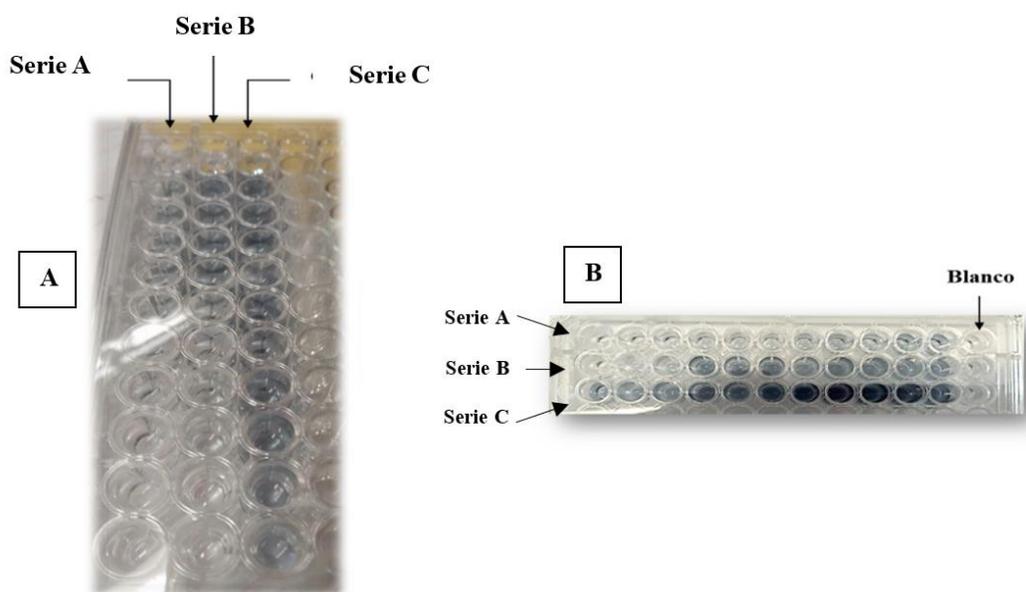


Figura 9. Formación de color para el ensayo de F-C en formato de MTPs
(A) Vista lateral de una MTP: se muestran las respuestas colorimétricas de las tres series ensayadas. (B) Vista superior de una MTP: se muestra además la respuesta del blanco de reactivos. Serie A: concentraciones crecientes de ácido *p*-cumárico; Serie B: concentraciones crecientes de ácido cafeico; Serie C: concentraciones decrecientes de ácido *p*-cumárico y crecientes de ácido cafeico.

Los datos de absorbancia (**Figura 10**) proporcionan la siguiente información: en la Serie A, que abarca concentraciones crecientes de ácido *p*-cumárico, se identificó un rango lineal de 0 a 0.28 mM con un ajuste de $R^2=0.96$; en la serie B, con concentraciones crecientes de ácido cafeico, se identificó un rango lineal de 0 a 0.4 mM, e incluso superior, con un ajuste de $R^2=0.98$. Sin embargo, se presentó variabilidad a partir de concentraciones mayores a 0.3 mM. Respecto a la Serie C, que comenzó con 0.4 mM de ácido *p*-cumárico y 0 mM de

cafeico, se registró una absorbancia inicial (ordenada al origen) de 0.29 y la linealidad ($R^2=0.8$) se mantuvo por encima de este valor conforme se disminuyó la concentración de *p*-cumárico a 0 mM y se aumentó la de cafeico hasta 0.4 mM.

Considerando la pendiente del rango lineal, se observó que la intensidad de absorbancia obtenida con el ácido cafeico fue 2.2 veces mayor que la del ácido *p*-cumárico. Este fenómeno podría atribuirse a las diferencias en la estructura química de estos compuestos, dado que el ácido cafeico cuenta con un grupo hidroxilo más que el ácido *p*-cumárico, lo que podría resultar en una mayor transferencia de electrones hacia los complejos del reactivo de Folin.

En la serie que incluyó ambos compuestos, solo fue posible distinguir la presencia del ácido cafeico del *p*-cumárico cuando sus concentraciones superaron los 0.28-0.3 mM.

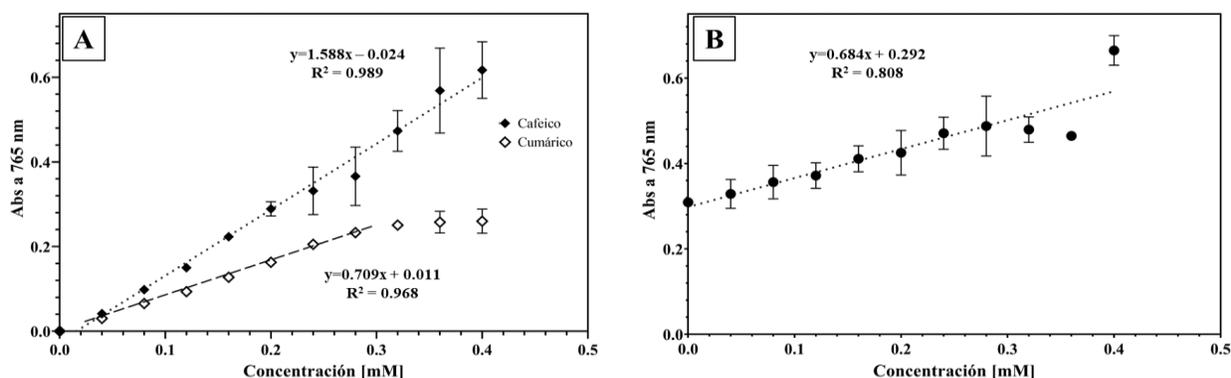


Figura 10. Curvas estándar para el ensayo de F-C en condiciones estándar.

(A) Comparación del rango lineal entre el ácido *p*-cumárico y ácido cafeico, con el promedio \pm SD. (B) Curva obtenida de la Serie C, que muestra concentraciones crecientes de ácido cafeico y decrecientes de ácido *p*-cumárico, de 0 a 0.4 mM. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

➤ Condiciones estándar, en presencia de lisado celular

Al agregar lisado celular al medio de reacción, se obtuvieron los siguientes datos: Para las series con concentraciones crecientes de ambos compuestos, se identificó un rango lineal de 0 a 0.4 mM, con $R^2 > 0.9$. Sin embargo, nuevamente se observa una discrepancia en los datos cuando se ensayaron concentraciones superiores a 0.28 mM (*Figura 11A*). Además, se notó una disminución en la intensidad de coloración obtenida con el ácido cafeico en comparación con la obtenida en ausencia de lisado celular.

En cuanto a la Serie C, se observó un comportamiento similar a las condiciones estándar, donde la linealidad comenzó a partir de 0.257. Esto indica que valores por encima de este umbral indicarían la presencia de ácido cafeico como producto de la reacción cuando está presente el ácido *p*-cumárico (*Figura 11B*).

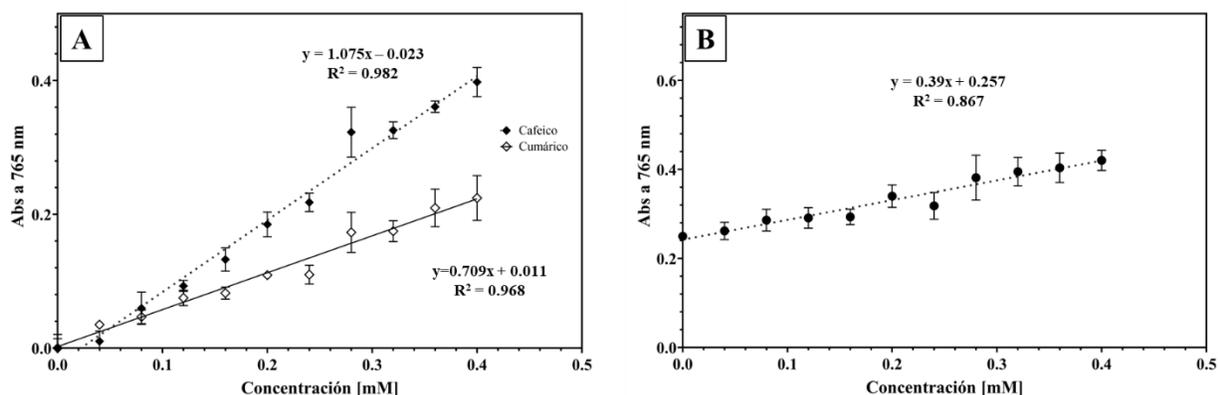


Figura 11. Curvas estándar para el ensayo de F-C en presencia de lisado celular.

(A) Comparación entre las curvas obtenidas de ácido *p*-cumárico y ácido cafeico, con el promedio \pm SD. (B) Curva obtenida de la Serie C, que muestra concentraciones crecientes de ácido cafeico y decrecientes de ácido *p*-cumárico, de 0 a 0.4 mM. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

➤ Condiciones estándar, en presencia de lisado celular y de NADPH

En presencia de lisado celular y NADPH, se logró un ajuste lineal con $R^2 > 0.935$ para ambas series de concentraciones crecientes de ácido cafeico y ácido *p*-cumárico, lo que descarta la interferencia del lisado celular en la linealidad. No obstante, según se observa en la gráfica A de la **Figura 12A**, cuando la concentración de ambos compuestos es de 0 mM, la curva lineal inicia por arriba de 0.355 y de 0.4032, respectivamente. Esto sugiere que la presencia de NADPH en el medio de reacción contribuye a la absorbancia registrada. Este patrón se confirma en la Serie C (**Figura 12B**), donde la presencia del NADPH aumenta los valores de absorbancia en 2.25 veces. Se esperaba que, dado que el NADPH se adiciona en exceso, esta contribución se mantuviera constante y, por ende, no afectara la detección de la aparición de ácido cafeico.

De manera general, con el ensayo de F-C se obtuvieron curvas lineales con una buena correlación de los datos para concentraciones crecientes de ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico, incluso en presencia del NADPH. Además, la intensidad de la coloración obtenida por el ácido cafeico fue mayor que la del cumárico. Teniendo en cuenta la contribución en la absorbancia del NADPH, se puede establecer una línea base que indica la presencia de ácido cafeico. Sin embargo, para la detección de este compuesto con el ensayo de F-C, una variante debe producir concentraciones por arriba de 0.28 mM, lo que implica que al menos el 70% del sustrato debe ser convertido.

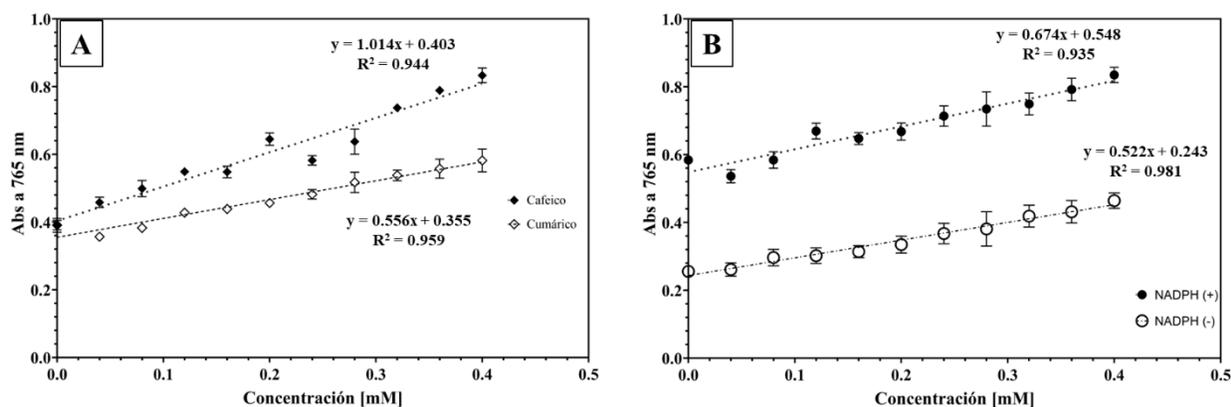


Figura 12. Curvas estándar para el ensayo de F-C en presencia de lisado celular y NADPH. (A) Comparación de las respuestas obtenidas para la Serie A (ácido *p*-cumárico) y Serie B (ácido cafeico). (B) Curva obtenida de la Serie C en presencia (+) y ausencia (-) de NADPH. Se muestra el valor promedio \pm SD. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.1.2 Ensayo de Fe(III)-FZ

Siguiendo la estrategia desarrollada, se llevaron a cabo varios ensayos considerando la influencia del lisado celular, la interferencia del NADPH y la contribución tanto del ácido *p*-cumárico como del ácido cafeico cuando se encuentran en la misma mezcla de reacción.

En el ensayo de Fe(III)-FZ, se produce la formación de color morado que va en función de la capacidad antioxidante de los compuestos presentes, tal como se obtuvo con el ácido cafeico (*Figura 13*) en el que la formación de color estuvo en función de su concentración, mientras que con el ácido *p*-cumárico no se presentaron cambios de coloración incluso en la concentración ensayada más alta (0.4 mM), que fue similar al blanco empleado (buffer KPi más ddH₂O). Esta observación sugiere que el ensayo de Fe(III)-FZ genera cambios de coloración específicamente en presencia del ácido cafeico y no del ácido *p*-cumárico. La Serie C fue fundamental para confirmar esta observación, ya que en esta serie ambos compuestos estaban presentes en la mezcla y la formación de color fue similar a la curva del ácido cafeico.

Por lo tanto, se determinó directamente la sensibilidad del ensayo y el rango lineal en presencia de lisado celular y NADPH, dado que estas son las condiciones presentes en el tamizaje de la librería de variantes. Por esta razón, se omite la presentación de los datos de absorbancia en condiciones estándar.



Figura 13. Formación de color para el ensayo Fe(III)-FZ en formato de MTPs.

Serie A: Concentraciones crecientes de ácido *p*-cumárico; Serie B: Concentraciones crecientes de ácido cafeico; Serie C: Concentraciones decrecientes de ácido *p*-cumárico y crecientes de ácido cafeico.

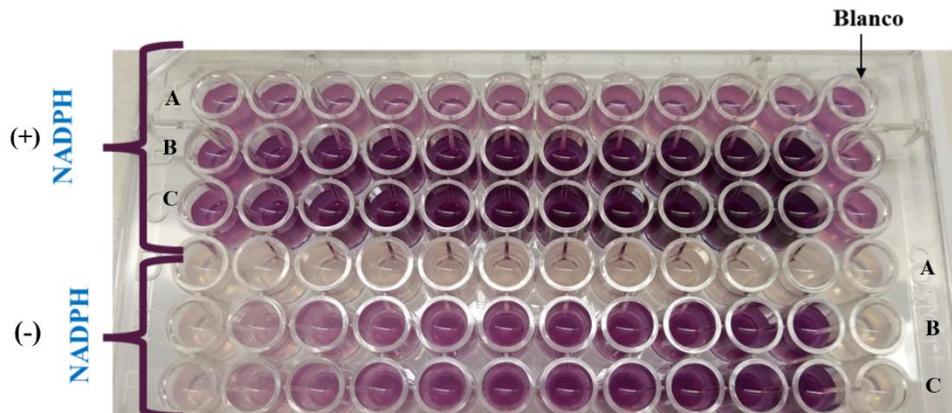


Figura 14. Formación de color en presencia y ausencia de NADPH, para el ensayo de Fe(III)-FZ. (A, B y C) Muestran la formación de color de la serie A, serie B y serie C, respectivamente, en presencia (+) o ausencia (-) de NADPH.

➤ **Condiciones estándar, en presencia de lisado celular**

En presencia de lisado celular, la curva correspondiente al ácido *p*-cumárico no mostró un rango lineal, ya que el coeficiente de determinación (R^2) fue apenas de 0.23, careciendo de un aumento proporcional en función de la concentración (**Figura 15A**). En contraste, la curva del ácido cafeico demostró un rango lineal con $R^2=0.993$ en las concentraciones ensayadas (0 a 0.4 mM) y una sensibilidad detectable a partir de 0.04 mM.

Al analizar la Serie C (**Figura 15B**) que representa concentraciones crecientes de ácido cafeico y decrecientes de ácido *p*-cumárico, se observó una tendencia lineal con $R^2=0.9907$. Esto sugiere que la presencia del sustrato (ácido *p*-cumárico) no interfiere en la formación de color cuando se está generando producto (ácido cafeico). Además, al comparar la ecuación de la recta de la serie B y C, se observa que las pendientes son similares, lo que indica que el rango lineal del ácido cafeico en presencia del cumárico se mantiene.

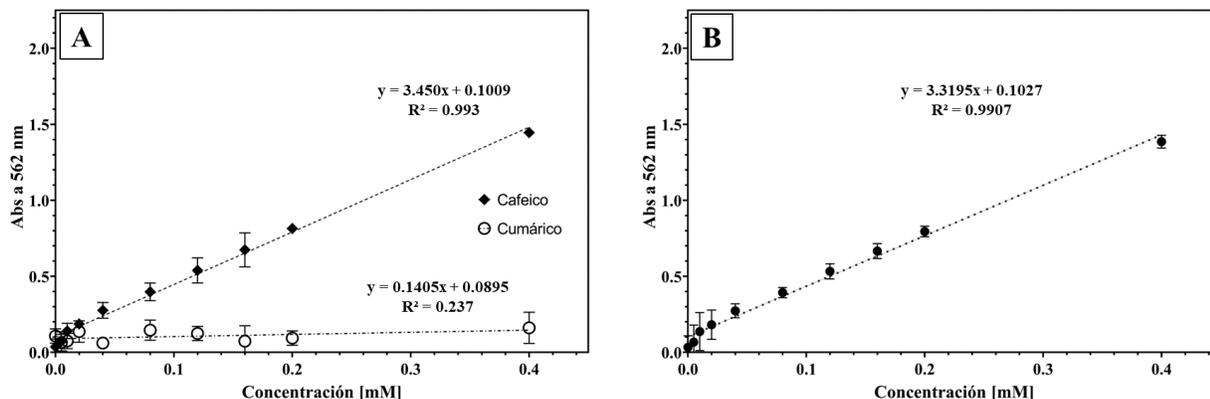


Figura 15. Curvas estándar para el ensayo de Fe(III)-FZ en presencia de lisado celular. (A) Comparación entre las curvas obtenidas para el ácido *p*-cumárico y ácido cafeico. (B) Curva obtenida de la Serie C. Se muestra el valor promedio \pm SD. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

➤ Condiciones estándar, en presencia de lisado celular y de NADPH

En las condiciones que se manejarían durante el tamizaje de las variantes, la curva correspondiente al ácido *p*-cumárico carece de una linealidad ($R^2=0.26$) en todas las concentraciones ensayadas (**Figura 16A**). No se observan diferencias significativas en la formación de color entre concentraciones de 0.04 mM y 0.4 mM, siendo ambas similares al blanco de reactivos. Por otro lado, la curva del ácido cafeico exhibe un comportamiento lineal en función de la concentración con un $R^2=0.994$. Sin embargo, a una concentración 0 mM se registró un valor inicial de Abs=0.688, indicando la contribución del NADPH a este valor. Esta observación se aprecia mejor en la **Figura 16B**, que corresponde a la serie C, donde en ausencia de NADPH, la curva de ambos compuestos inicia en 0.10, mientras que en presencia de NADPH inicia en 0.7. Además, en la serie C el rango lineal del ácido cafeico cuando está presente el ácido *p*-cumárico, el NADPH y el lisado celular en el medio de reacción, con una sensibilidad para producir un cambio de color de alrededor de 0.04 mM.

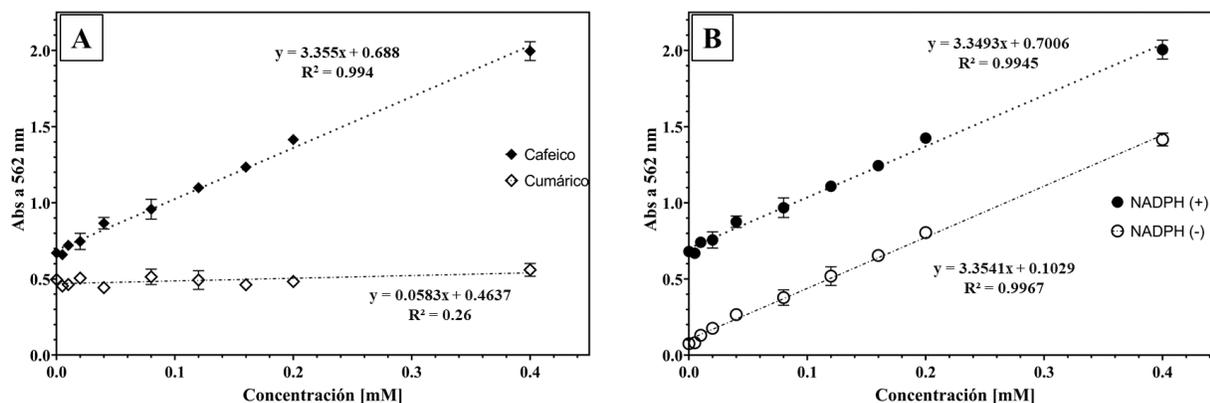


Figura 16. Curvas estándar para el ensayo de Fe(III)-FZ en presencia de lisado celular y NADPH. **(A)** Comparación entre las curvas obtenidas para el ácido *p*-cumárico y ácido cafeico. **(B)** Curva obtenida de la Serie C, en presencia (+) y ausencia (-) de NADPH. Se muestra el valor promedio \pm SD. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

En términos generales, el ensayo de Fe(III)-FZ permite obtener un rango lineal en función de la concentración de ácido cafeico (de 0.02 a 0.4 mM), incluso en presencia de sustrato, NADPH y lisado celular. En contraste, no se observa una respuesta lineal para el ácido *p*-cumárico en ninguna concentración, lo que significa que incluso a concentraciones elevadas (0.4 mM), el cambio de coloración es insignificante, lo que facilitaría la identificación de la producción de ácido cafeico en una mezcla de reacción. Se evidencia que el NADPH contribuye a la formación de color cuando está presente en el medio; por lo tanto, un valor inicial (por ejemplo Abs=0.7) podría servir como línea base para indicar la presencia de ácido cafeico cuando se superen estos valores.

Ensayo de F-C vs Ensayo de Fe(III)-FZ

Ambos ensayos muestran una respuesta lineal respecto a la concentración de ácido cafeico y exhiben una sensibilidad similar a bajas concentraciones. Sin embargo, se presenta interferencia debido al lisado celular, y la presencia del NADPH contribuye a la generación de color.

El rango lineal del ensayo de F-C para el ácido cafeico abarca desde 0.04 hasta 0.28 mM, mientras que en el ensayo de Fe(III)-FZ va desde 0.02 hasta 0.40 mM (*Tabla 3*). Además, para distinguir la presencia de ácido cafeico del sustrato en una mezcla, se requiere una concentración mínima de 0.28 mM en el ensayo de F-C, en comparación con solo 0.04 mM con el ensayo de Fe(III)-FZ.

Por lo tanto, considerando los resultados presentados, se ha validado y establecido el ensayo de Fe(III)-FZ como el método preferido para identificar variantes productoras de ácido cafeico, teniendo en cuenta su sensibilidad, rango lineal y desviación estándar.

Tabla 3. Comparación del método de F-C vs el método de Fe(III)-FZ.

	Ensayo de F-C	Ensayo de Fe(III)-FZ
Rango lineal	0.04-0.28 mM	0.02-0.40 mM
Límite de detección	0.04 mM	0.04 mM
Interferencia del NADPH	Sí	Sí
Interferencia del lisado celular	Sí	Sí
Concentración mínima de ácido cafeico detectable en una mezcla	0.28 mM	0.04 mM
Tiempo mínimo dedicado	2 horas	30 minutos

6.2 Construcción de la biblioteca de mutantes del P450_{BM3}

6.2.1 Construcción de variantes en T438

Se realizó la construcción de la biblioteca en la posición 438, siguiendo la estrategia descrita en la sección 5.21.2 y realizando las reacciones de PCR según lo detallado en el Anexo 1. El proceso de construcción se resume en la **Figura 17**, en el cual se obtuvo el fragmento llamado “T438/XhoI” que se clonó en el vector pET28a. Después de transformar el producto de ligación, se contabilizaron 4,360 de colonias transformantes, lo que abarcó el 100% de la variabilidad prevista. Para cubrir el 95% de las variantes generadas por la combinación de nucleótidos se requerían 52 clonas, y por la combinación de aminoácidos, 39. La información sobre el número de colonias obtenidas en cada paso se resume en la **Tabla 4**.

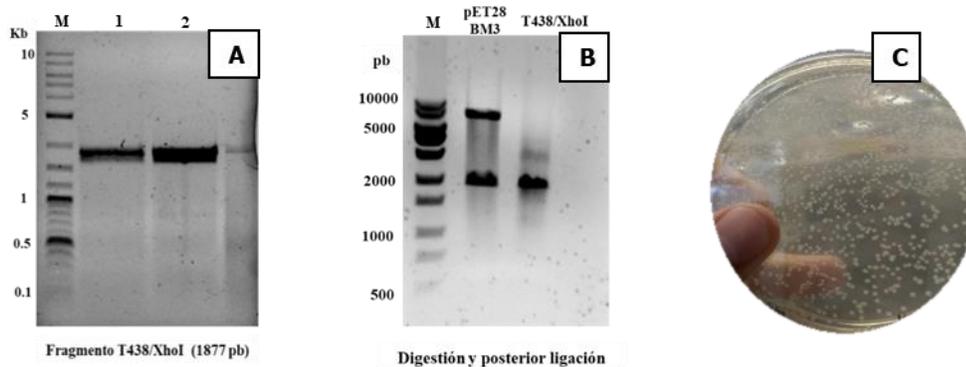


Figura 17. Construcción de mutaciones en la posición 438.

(A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con el fragmento generado por PCR. **M:** Marcador de peso molecular, **1 y 2:** producto de PCR que corresponde a un tamaño de 1877 pb. (B) Doble digestión SacI/XhoI del vector pET28a, se visualizan las bandas esperadas de 1866 pb y 6520 pb, **M:** Marcador de peso molecular. (C) Colonias transformantes en *E. coli* MC1061, que fueron contabilizadas para evaluar la eficiencia de transformación

La PCR de colonias reveló que 9 de cada 10 contienen el gen clonado (*Figura 18*), reflejando una eficiencia de clonación del 90%. La cantidad de colonias transformantes indicó una eficiencia de clonación adecuada, lo que llevó a seleccionar algunas de las colonias con PCR positiva para el aislamiento del ADN plasmídico y su posterior secuenciación en busca de cambios en la posición 438. Los resultados de secuenciación se muestran en la *Figura 19*.

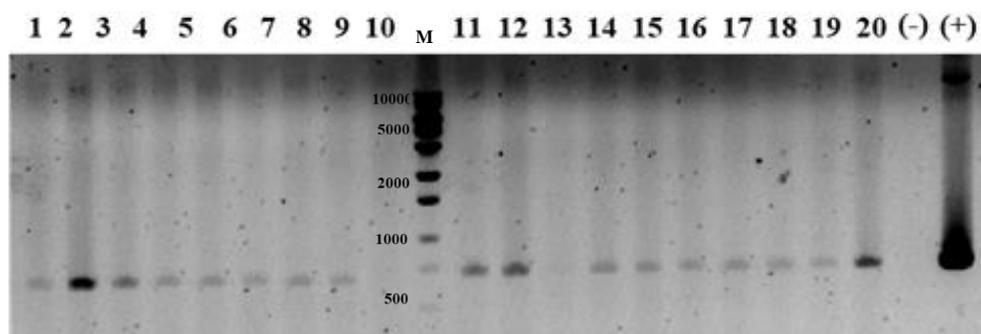


Figura 18. PCR de colonias transformantes con mutaciones en 438. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, carriles 1-20: PCR de 20 colonias transformantes seleccionadas al azar, M: Marcador de peso molecular. (-) y (+) control de PCR negativo y positivo respectivamente. La banda del control positivo corresponde a un tamaño de 724 pb.

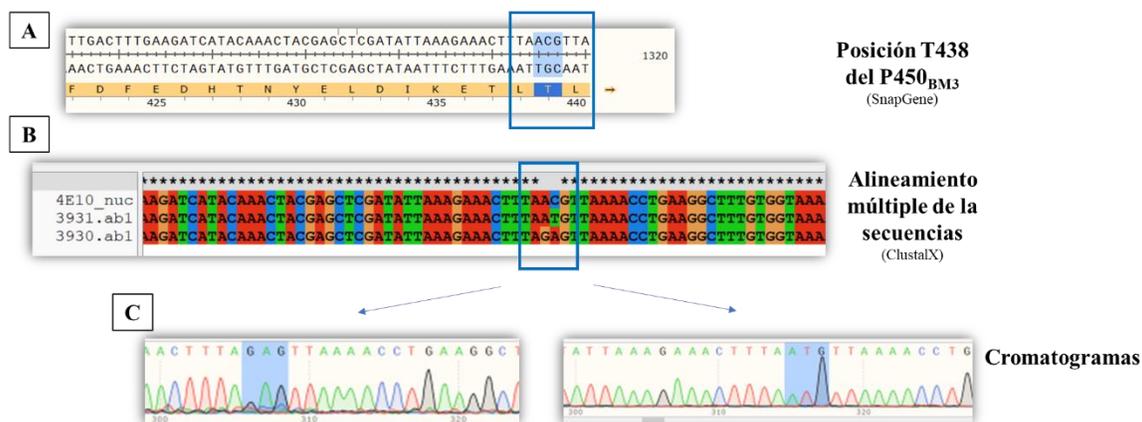


Figura 19. Mutaciones en la posición T438 confirmadas por secuenciación. (A) Codón silvestre del aminoácido T438 del P430_{BM3} visualizado en SnapGene. (B) Alineamiento de la secuencia de DNA del P430_{BM3} WT vs. las secuencias de las dos clonas seleccionadas. (C) Cromatogramas donde se observa el cambio de secuencia en el codón de la posición 438.

Los resultados de secuenciación indican mutaciones en la posición 438, siendo el codón silvestre ACG, mientras que dos de las variantes mostraron cambios a ATG y GAG, es decir, cambios de treonina (WT) por metionina y glutamato. Se decidió recuperar el banco de colonias y aislar el ADN plasmídico. Esta biblioteca de ADN se llamó “pETmR438” y fue empleado como vector para la construcción de la biblioteca completa en la que el inserto fue la región hemo mutagenizada en las posiciones 47, 82, 87, 328 y 330.

6.2.2 Construcción de variantes en 47/82/87

De manera similar, tras realizar las reacciones de PCR (como se muestra en el Anexo 1), se obtuvo un fragmento completo del dominio hemo con mutaciones en las posiciones 47, 82 y 87, que luego se extendió a un sitio posterior a SacI para su clonación (ver *Figura 8*, resultados en *Figura 20*). Una vez clonado el gen y transformado, se obtuvieron alrededor de 20,000 colonias transformantes, lo que supuso una sobrerrepresentación de la variabilidad para este paso, ya que por la combinatoria de nucleótidos se necesitaban 10,368 colonias para cubrir el 95% de las variantes generadas, mientras que por la combinatoria de aminoácidos se necesitaban 2,496 colonias transformantes (ver *Tabla 8*).

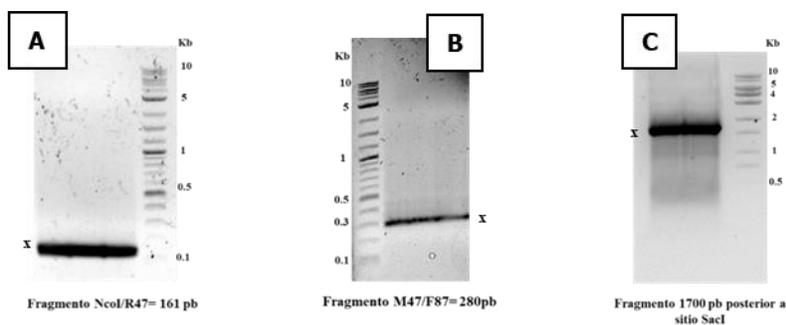


Figura 20. Mutagénesis por PCR sobre los sitios 47, 82 y 87.

(A) Fragmento generado hasta la posición 47, de 161 pb. (B) Fragmento extendido a 82/87, de 280 pb. (C) Extensión del megaprimer 47/82/87 posterior al sitio de corte SacI, de 1700 pb. 1: Corresponde a las bandas observadas de los productos de PCR en cada proceso.

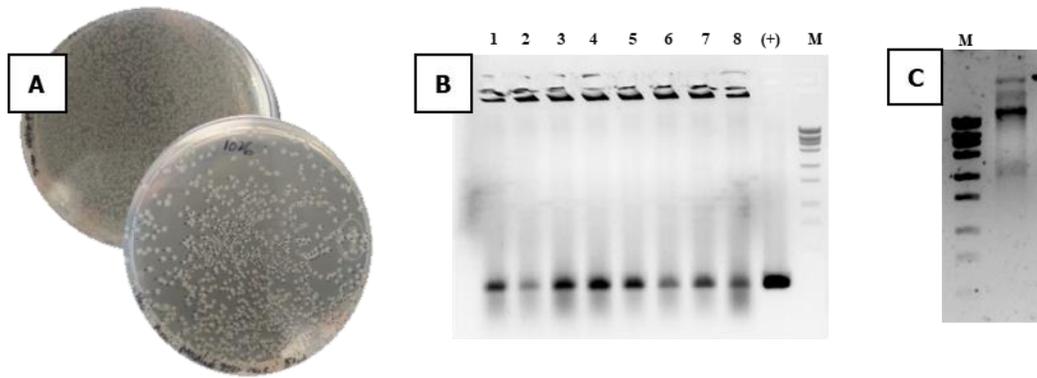


Figura 21. Análisis de la librería 47/82/87.

(A) Colonias transformantes, donde en 50 μ L de suspensión se obtuvieron 1036. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la PCR de colonias, **1-8** resultado positivo en las colonias seleccionadas, (+) control positivo de PCR, **M**: Marcador de peso molecular. (C) ADN plasmídico aislado del banco de colonias.

El análisis del banco de colonias mediante PCR indicó la presencia del gen en 8 clonas seleccionadas (**Figura 21B**). Se decidió aislar el ADN plasmídico de un par de clonas y obtener su secuencia, la cual es mostrada a continuación (**Figura 22**).

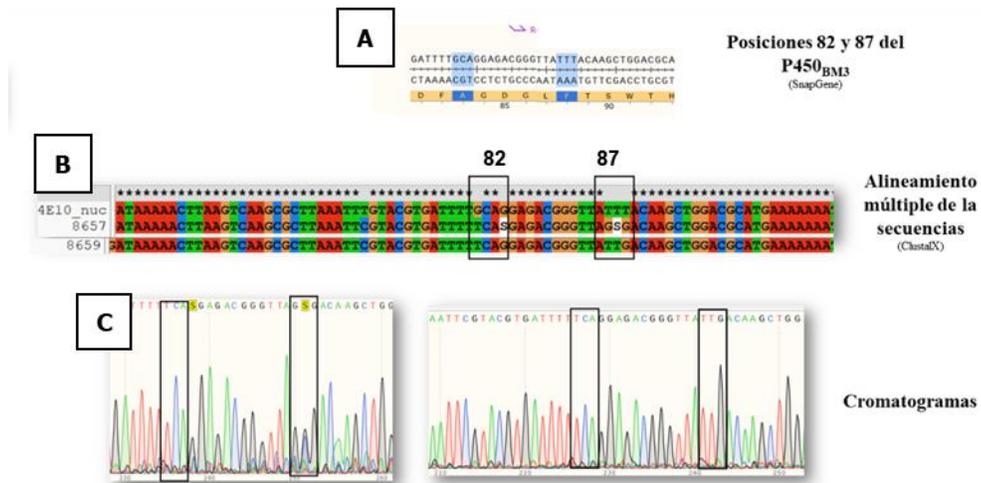


Figura 22. Mutaciones en las posiciones 82/87 confirmadas por secuenciación.

(A) Codones silvestres de los aminoácidos 82 y 87 del P430_{BM3}, visualizado en SnapGene. (B) Alineamiento de secuencias del P430_{BM3} WT vs. las secuencias de los dos plásmidos secuenciados, indicando los cambios en las posiciones 82 y 87. (C) Cromatogramas donde se observa el cambio de secuencia en los codones correspondientes.

Conforme a los resultados de secuenciación, que mostraron cambios en las posiciones 47, 82 y 87, al mismo tiempo que se descartaron mutaciones espurias, se decidió recuperar el ADN plasmídico de todo el banco de colonias que fue empleado como templado en reacciones de PCR que adicionaron mutaciones en las posiciones 328 y 330.

6.2.3 Construcción de variantes en 328/330

La biblioteca de variantes sobre la región del dominio hemo (posiciones 47, 82, 87, 328, 330) se finalizó adicionando mutaciones en las dos últimas posiciones mediante reacciones de PCR, (productos se muestran en la *Figura 23*). Posteriormente, el fragmento que contuvo la región del dominio hemo mutado se empleó como inserto para clonarlo con el plásmido pETmR438, dando lugar a la obtención de la librería de variantes completa.

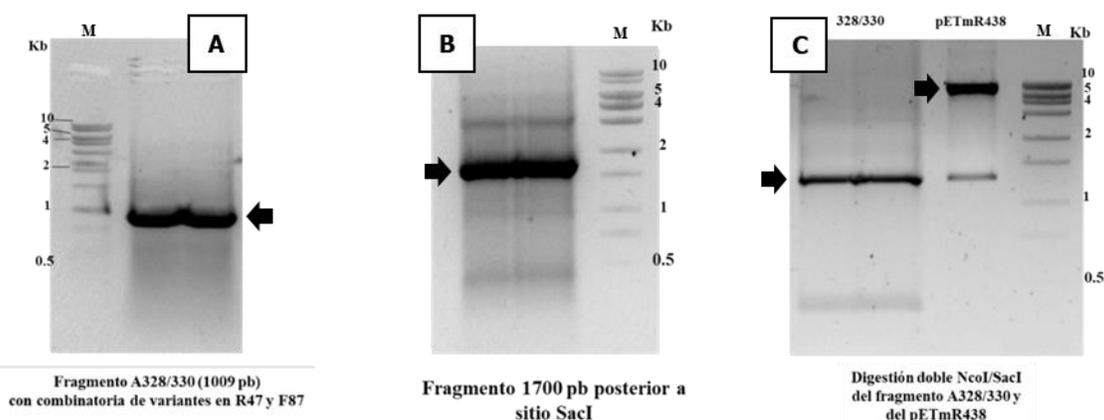


Figura 23. Construcción de variantes en A328/330.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% de (A) Fragmento generado hasta la posición A328/330, de 1009 pb; (B) Extensión del fragmento posterior a SacI, de 1700 pb; (C) Obtención del inserto A328/330 de 1290 pb y del vector pETmR438 de 6680 pb. Se señalan con una flecha las bandas que fueron purificadas para el posterior proceso.

Para determinar el tamaño de la librería completa, se realizó un cálculo partiendo de una suspensión bacteriana de 200 μL distribuida en una placa de Petri, de la cual se obtuvieron 5200 colonias transformantes. Basándonos en esto, se estimó que el total de variantes sería de 26,000. Sin embargo, dado que la eficiencia de clonación según la PCR de colonias fue del 80% (**Figura 24B**), el número de variantes recuperadas fue de alrededor de 20,800 clonas. Esto representa el 33% del total de colonias transformantes necesarias para cubrir el 95% de la variabilidad generada. Según la combinatoria de nucleótidos, se requerían cerca de 60,000 colonias transformantes (**Tabla 4**). A pesar de esto, se optó por recuperar el banco de ADN para dar inicio al proceso de tamizaje de variantes. Los resultados de secuenciación de algunas clonas seleccionadas al azar se muestran en la **Figura 25**.

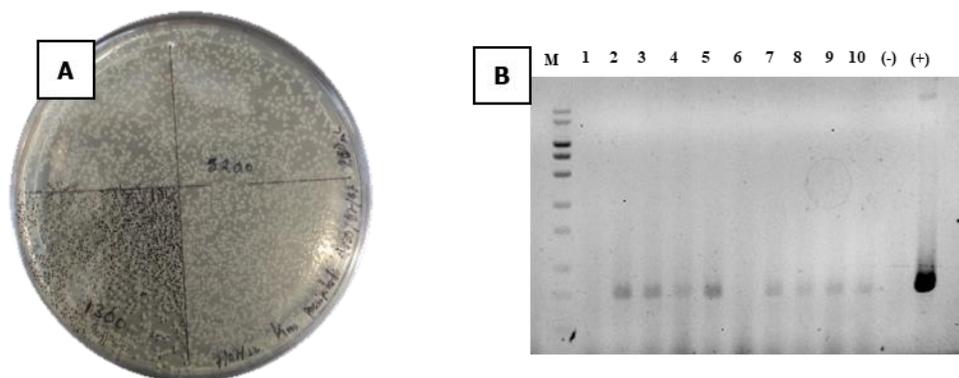


Figura 24. Análisis de la librería completa.

(A) Colonias transformantes, donde a partir de 200 μL de suspensión se contabilizaron 5200. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la PCR de colonias de 10 colonias muestreadas, (-) y (+) controles negativo y positivo (724 pb), respectivamente.

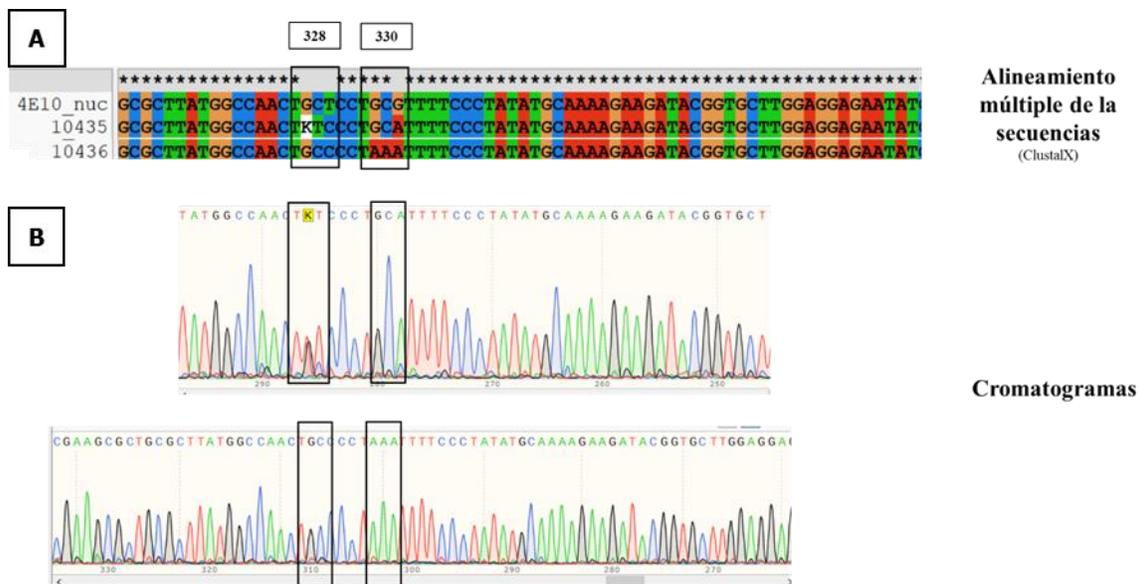


Figura 25. Mutaciones en las posiciones 328/330 confirmadas por secuenciación.

(A) Alineamiento de secuencias del P430_{BM3} WT vs. las secuencias provenientes de los plásmidos secuenciados. (B) Cromatogramas donde se observa el cambio de secuencia en los codones correspondientes.

En la **Tabla 4** se resume el número de colonias transformantes obtenidas en cada paso y el número de colonias que se esperaba obtener para cubrir el 95% de todas las variantes generadas. Como se puede observar, solo en la construcción final no se alcanzó el número de variantes necesarias, mientras que en las librerías previas se obtuvo un número adecuado de variantes.

Tabla 4. Número de colonias vs. combinatoria de nucleótidos y aminoácidos esperada.

	No. de variantes a nivel de nucleótidos	No. de variantes a nivel de proteína	No. de colonias para cubrir el 95% de todas las posibles variantes	No. de transformantes obtenidas
Librería de variantes T438	18	13	52	4360
Librería de variantes 47/82/87/438	3456	832	10368	20720
Librería completa 47/82/87/328/330/438	20736	1440	62118	26000

6.3 Tamizaje de la biblioteca de variantes del P450_{BM3}

6.3.1 Presencia del P450_{BM3} y ensayos de actividad

Antes de iniciar el proceso de tamizaje de la librería generada, se llevó a cabo una serie de pruebas para asegurar la presencia y actividad adecuada del P450_{BM3} en los lisados celulares obtenidos mediante lisis enzimática. Esto se verificó mediante SDS-PAGE para confirmar la presencia de la proteína. Además, se evaluó que la cantidad de proteína extraída fuera suficiente midiendo el consumo de NADPH al monitorear la absorbancia a $\lambda=340\text{nm}$ tras la adición de ácido esteárico como sustrato. Se utilizó al P450_{BM3} WT como control y se incluyó una mezcla de reacción sin enzima como. Se realizó un seguimiento del consumo del NADPH durante 15 minutos para observar su cinética.

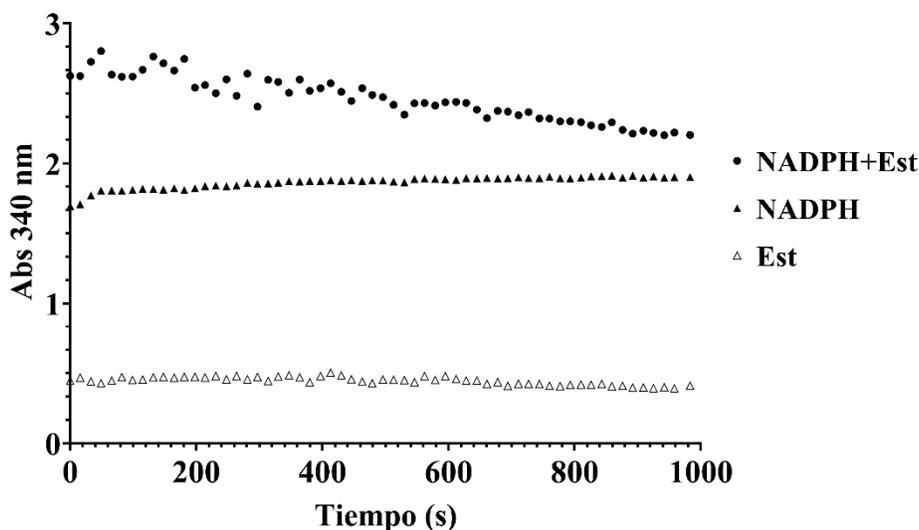


Figura 26. Consumo de NADPH a 340 nm obtenida del lisado celular. Se comparan el consumo de NADPH cuando se agregó al lisado celular NADPH (NADPH), estearato como sustrato y NADPH (NADPH + Est) y como control buffer con estearato (Est).

Se compararon las actividades de los lisados celulares obtenidos mediante sonicación y lisis enzimática para determinar si con este último método era suficiente (que es como se haría en un formato de alta eficiencia). De acuerdo con los resultados mostrados en la **Figura 26**, se observa un ligero consumo de NADPH (0.032 min^{-1}) cuando se agrega ácido esteárico como sustrato. Por otro lado, en ausencia de sustrato, las lecturas de absorbancia indican que

no hay consumo de NADPH a través del tiempo. En contraste, el lisado celular obtenido por sonicación, mostró un mayor consumo de NADPH en presencia del sustrato (0.065 min^{-1}), tal como se observa en la *Figura 27*. Sin embargo, también se observó un consumo de NADPH en ausencia de sustrato (0.11 min^{-1}), lo cual podría explicarse por la presencia de ácidos grasos en el extracto crudo debido a la ruptura de la membrana lipídica durante la sonicación, los cuales podrían estar siendo utilizados como sustrato del P450_{BM3}.

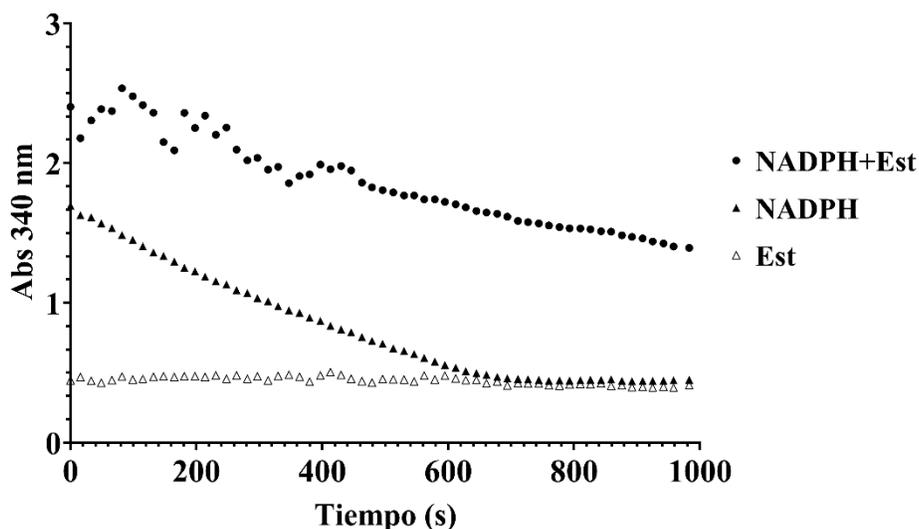


Figura 27. Consumo de NADPH a 340 nm del extracto por sonicación. Se comparan el consumo de NADPH cuando se adicionó al extracto por sonicación (NADPH); estearato como sustrato y NADPH (NADPH + Est) y como control el buffer con estearato (Est).

Aunque el lisado celular obtenido mediante lisis enzimática muestra un menor consumo de NADPH en comparación con el obtenido por sonicación ($0.032 \text{ vs } 0.065 \text{ min}^{-1}$), se ha determinado que la lisis celular empleando lisozima, DNAsa I y MgCl_2 permite obtener un extracto proteico del P450_{BM3} con actividad detectable. Por lo tanto, este método se consideró adecuado para la metodología que fue desarrollada en los pasos siguientes, especialmente teniendo en cuenta que en tamizaje en formato de alta eficiencia (HTS) los volúmenes de medio de cultivo son menores a 1 mL y que se trata de ensayos en placas de 96 pozos, con volúmenes no mayores a 200 μL .

Simultáneamente, se llevó a cabo un análisis de los lisados celulares obtenidos mediante ambos métodos a través de un SDS-PAGE, con el objetivo de identificar si el P450_{BM3} silvestre está sobreexpresado y en una cantidad suficiente con los tiempos de inducción y concentraciones de IPTG ensayadas.

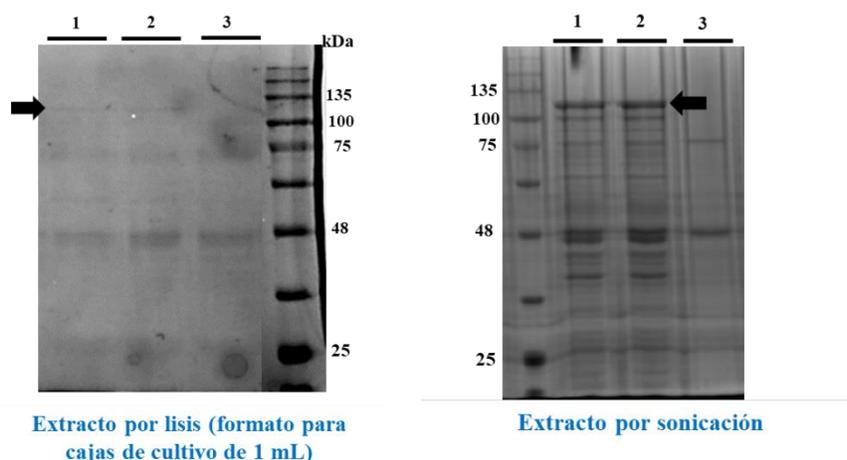


Figura 28. SDS-PAGE de los lisados celulares.

(1) y (2) Muestra procedente de P450_{BM3}. (3) Control sin inducir, se observan bandas de lisozima y DNasa. Las flechas indican la banda que corresponde al P450_{BM3}, con un tamaño de 119.5 kDa.

Los resultados obtenidos en el SDS-PAGE revelaron que es posible obtener un extracto con presencia del P450_{BM3} utilizando el método de lisis enzimática. Por otro lado, mediante sonicación, que proporciona un lisado celular con mayor cantidad de proteína, se observó que el P450_{BM3} está sobreexpresado a las 18 h post-inducción con IPTG 0.25 mM (*Figura 28*).

Una vez confirmada la presencia de la proteína en los lisados celulares obtenidos y su actividad en el consumo de NADPH, se procedió con el tamizaje de la librería construida.

6.3.2 Tamizaje de la biblioteca empleando el ensayo de Fe(III)-FZ

Se inició con el análisis de 900 variantes, en dos lotes de 450 colonias. Se picaron colonias individuales en 5 cajas de cultivo de 96 pozos para la obtención del preinóculo, que posteriormente se juntaron en un pool de 5 colonias para la inducción, por lo que finalmente se tamizaron las 450 colonias en una sola placa de 96 (ver *Figura 29*).

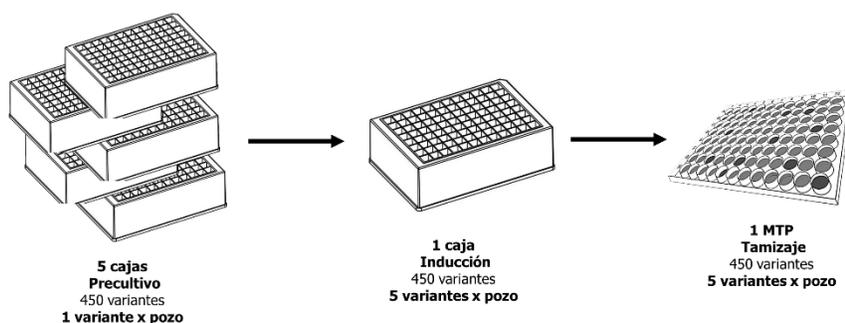


Figura 29. Ronda de tamizaje con pool de colonias.

Esquema simple que muestra el proceso de análisis variantes del P450_{BM3}, cuando se combinaron 5 variantes provenientes de un cultivo nocturno en un único pozo para su sobreexpresión y tamizaje.

En la *Figura 31* se muestran los datos obtenidos de las variantes una vez que se realizó el ensayo con Fe(III)-FZ. Para este proceso, el criterio de selección fue variantes con $Abs > 0.601$ tomando como referencia el promedio + DS del P450_{BM3} WT y la curva estándar construida para ácido cafeico (ver *Figura 30*). A partir de esto, se seleccionaron 12 pozos, de tal forma que fueron 60 colonias las que se incluyeron en dicha selección.

Las 60 colonias individuales, provenientes de los 12 pools de 5 colonias seleccionados, fueron sometidas a un segundo proceso de tamizaje para identificar las clonas con actividad dentro de las mezclas de colonias y así corroborar el fenotipo mostrado y descartar falsos positivos.

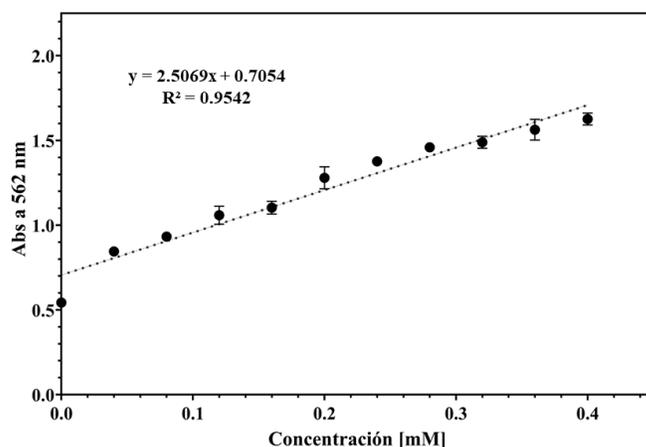


Figura 30. Curva estándar de ácido cafeico.

La curva se construye con ácido cafeico de 0 a 0.4 mM en una mezcla con lisado celular, NADPH y buffer KPi + ácido *p*-cumárico. A concentración de 0.04 mM se obtuvo una Abs = 0.8449.

A partir de los resultados obtenidos de las variantes sometidas a un segundo tamizaje, se seleccionaron 5 que repitieron el fenotipo (**Figura 32**) y se continuó con el análisis de sus posibles productos de reacción mediante TLC, que son mostrados en la **Figura 33**. El ensayo de TLC mostró que las variantes seleccionadas presentan una banda similar al ácido *p*-cumárico, mientras que no se observó alguna que correspondiera al ácido cafeico.

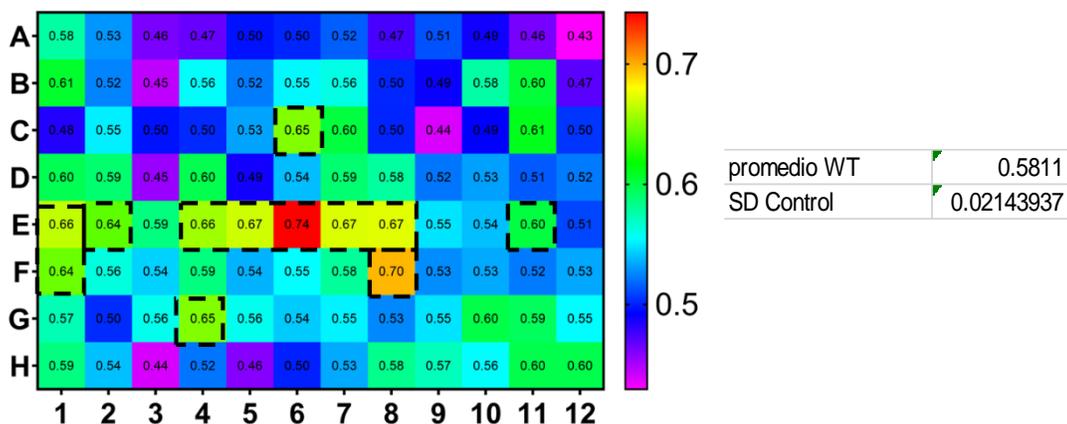


Figura 31. Tamizaje de variantes con el ensayo de Fe(III)-FZ

(Izquierda) Se muestra el mapa de color en función del valor de absorbancia obtenido por el ensayo de Fe(III)-FZ: los 12 pools seleccionados se encuentran dentro de un marco punteado, destacando el E6 al mostrar una absorbancia de 0.74. **(Derecha)** Se muestra el valor promedio de absorbancia obtenido con el P450BM3 WT=0.58 con SD=0.02.

A pesar de que en este primer análisis de 900 colonias no se identificaron variantes con potencial productor de ácido cafeico, se tuvo en cuenta algunas consideraciones inherentes al proceso de evolución dirigida. Por ejemplo, dado que se trata de un esfuerzo de selección en formato de alta eficiencia, en comparación con el análisis convencional de variantes, se trabaja en volúmenes reducidos de cultivo, inducción y ensayo colorimétrico (menores a 1 mL); por lo que, puede resultar en que algunas variantes no se produzcan en cantidad suficiente, aunado a la eficiencia del método de lisis celular empleado. Mientras que, en caso de obtenerse alguna variante con actividad pero sin la formación de producto detectable, esto puede atribuirse a fenómenos como el desacoplamiento en la transferencia de electrones hacia el sitio activo o la generación de especies reactivas de oxígeno (Morlock *et al.*, 2018).

Con referencia a las áreas de oportunidad, se logró identificar durante el tamizaje con Fe(III)-FZ que la formación de color se desarrolla en función del tiempo, ya que variantes colocadas en las columnas iniciales de las MTPs mostraron mayores valores de absorbancia en comparación con las ubicadas al final, por lo que para los tamizajes siguientes se consideró colocar una fila completa de P450_{BM3} WT que incluyera esta variación de datos.

Con respecto al proceso de tamizaje, resulta complejo el análisis a plenitud de la biblioteca de variantes generada, por lo que como alternativa fue la generación de una biblioteca más limitada en número de variantes y que pudiera ser muestreada completamente. Para ello, se recurrió a la búsqueda de trabajos previos que generaron alguna variante con la capacidad de utilizar compuestos aromáticos como sustrato, se planteó una propuesta de los aminoácidos a explorar y se analizó la viabilidad de las mutaciones mediante modelado molecular. De esta forma, se obtuvo una biblioteca acotada en números, que fue sometida a tamizaje y de la cual se seleccionaron variantes con características no presentadas anteriormente, resultados que son mostrados a continuación.

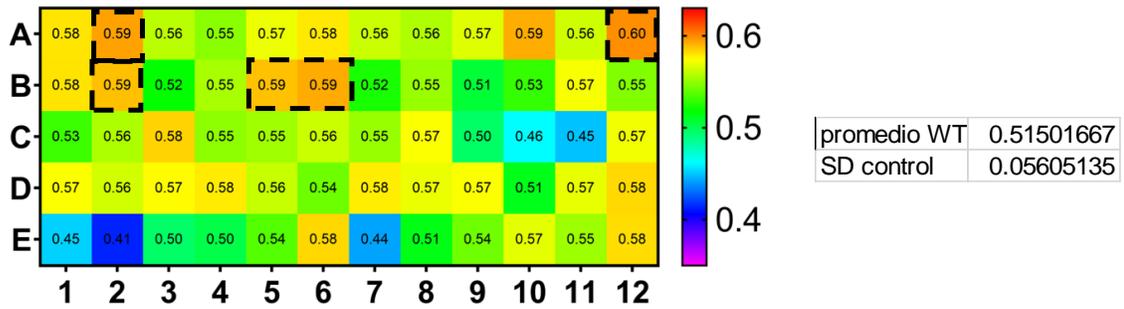


Figura 32. Segundo tamizaje de las 60 variantes seleccionadas.

(Izquierda) Se muestra el mapa de color que en función del valor de absorbancia obtenido por el ensayo de Fe(III)-FZ: cada celda corresponde una colonia individual, las seleccionadas se encuentran dentro de un marco punteado. **(Derecha)** Se muestra el valor promedio de absorbancia obtenido con el WT=0.51 y la SD=0.05.

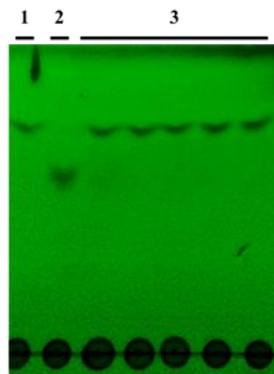


Figura 33. TLC.

(1) P450WT + ácido cafeico 0.4mM. **(2)** P450WT + ácido *p*-cumárico 0.4 mM. **(3)** Variantes seleccionadas. Fase móvil de cloroformo:metanol:ácido fórmico (85:15:1).

6.4 Construcción de librería acotada

6.4.1 Construcción *in silico* de la variante P450_{BM3} M3 y acoplamiento molecular

Se ha documentado que los residuos polares R47 y Y51 dificultan el acceso de sustratos estéricamente exigentes al centro activo, y que las mutaciones por R47S y Y51W, sin embargo, han facilitado la hidroxilación de *p*-xileno. Además, se ha identificado que F87 se encuentra directamente sobre el hemo (ver *Figura 3C*) y desempeña un papel importante en la orientación de anillos aromáticos mediante apilamiento aromático (Dennig *et al.*, 2012). Basándose en estas observaciones, Dennig *et al.*, 2017 desarrollaron una variante del P450_{BM3}, llamada M3, que incluye las mutaciones R47, Y51W, A330F y I401M, con la capacidad de hidroxilar mesitileno y pseudocumeno, *p*-xileno y etil-benceno.

Tomando en consideración la variante P450_{BM3} M3, se propuso generar nuevas variantes que incluyeran mutaciones en estas posiciones, en particular la mutación Y51W, que aumenta la hidrofobicidad en la entrada al sitio activo y mantiene un tamaño similar a la tirosina, y la mutación A330F, que se espera que mejore la energía de unión del ácido *p*-cumárico en el sitio activo.

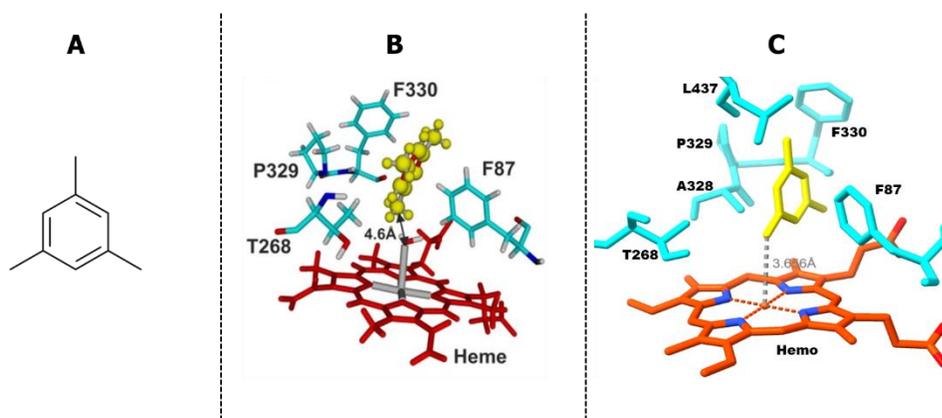


Figura 34. Acoplamiento molecular de mesitileno.

(A) Estructura del mesitileno. (B) Acoplamiento del mesitileno (amarillo) en el sitio activo de la variante M3 reportado por Dennig *et al.*, 2017. (C) Acoplamiento del mesitileno con la variante M3 construida *in silico*, el cual es similar al reportado y sirve como validación para el acoplamiento con ácido *p*-cumárico. Se empleó el PDB:1BU7.

Como parte complementaria de este proyecto, se realizó un análisis de las mutaciones a explorar mediante acoplamiento molecular empleando Autodock4. El protocolo consistió en construir *in silico* la estructura de la variante P450_{BM3} M3. Obtenida la variante *in silico*, se sometió a un proceso de rotamerización y minimización de energía, centrándose en el grupo hemo, para obtener los formatos PDBQT necesarios de la estructura proteica y del ligando necesarios para el acoplamiento.

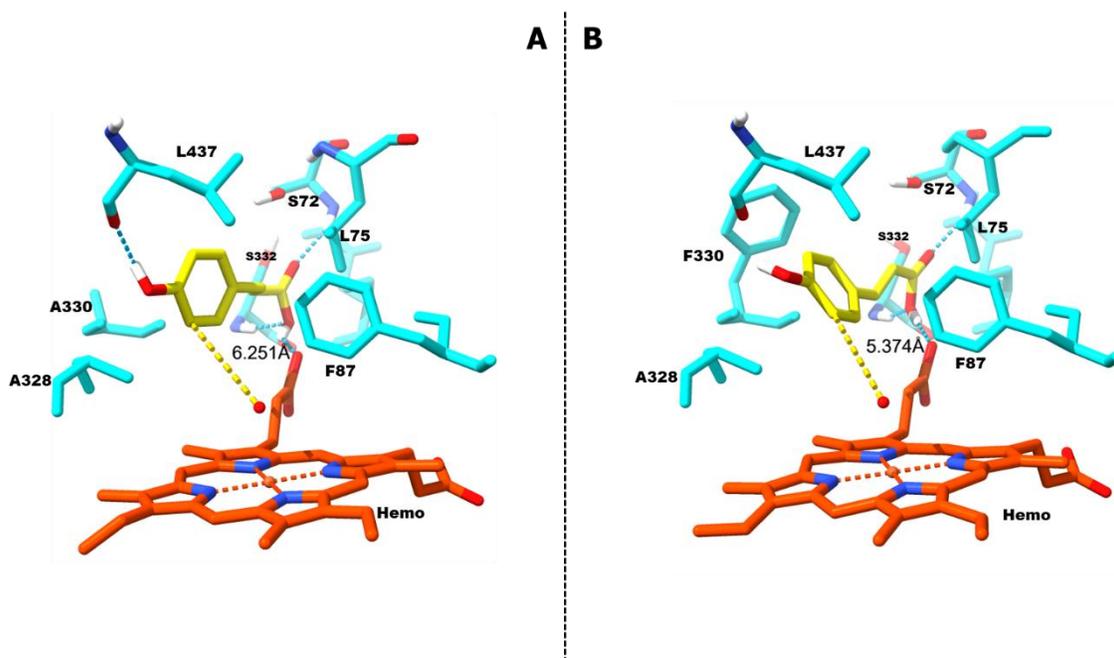


Figura 35. Acoplamiento molecular del ácido *p*-cumárico. (A) Acoplamiento molecular en el sitio activo del P450_{BM3} silvestre ($\Delta G_{\text{unión}}$: -4.67 kcal/mol). (B) Acoplamiento molecular en la variante M3 construida *in silico* ($\Delta G_{\text{unión}}$: -5.24 kcal/mol). Se empleó el PDB: 1BU7.

Una vez validado el acoplamiento molecular con el reportado por Dennig *et al.*, 2017, (Figura 34C), se procedió a realizar el acoplamiento del ácido *p*-cumárico, comparando las energías de unión en el sitio activo tanto en la estructura silvestre como en la construida *in silico*. Los resultados revelaron que en la variante M3, la mutación A330F genera una interacción de tipo π - π entre la fenilalanina 87, el ácido *p*-cumárico y la fenilalanina 330 (Figura 35B). Esta interacción de tipo π - π podría explicar el aumento teórico en la energía libre de unión, que pasa de -4.67 kcal/mol en la silvestre (Figura 35A) a -5.24 kcal/mol en la

variante M3. Además de que se favorece la cercanía a la molécula de agua cercana al grupo hemo para la catálisis, disminuyendo la distancia de 6.251 a 5.374 Å.

A partir de lo anterior, tomando como referencia lo reportado por Dennig *et al.*, 2017 y los resultados de acoplamiento, se diseñó una biblioteca de variantes alternativa. Esta biblioteca de variantes contempló mutaciones en R47S (como se propuso al inicio), así como las mutaciones adicionales en Y51W y A330F. En consecuencia, se diseñaron y sintetizaron oligos que introdujeron esta variabilidad propuesta (*Tabla 5*).

6.4.2 Construcción experimental

Se diseñó una biblioteca acotada a 300 variantes a nivel de DNA, que incluyó variabilidad en las posiciones 47, 51, 328 y 330. Para ello, se emplearon los oligonucleótidos de la *Tabla 5*, los cuales introdujeron las mutaciones R47S, Y51W, A328A/F/V y A330P/F/W, que de acuerdo con la literatura, permiten el uso compuestos aromáticos como el tolueno, p-xileno y mesitileno como sustrato. (Dennig *et al.*, 2017).

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la biblioteca acotada.

Nombre del oligo	Mutación introducida	Secuencia (5'>3')*
R47S/ Y51W	R47S Y51W	CTTGATAACCAGCGCGTTAC SCTACCAGGCG
A328 330	A F V P F W	AGGGAAAAMVVAGGGRMAGTTGGCC

Se llevaron a cabo PCR utilizando los oligonucleótidos degenerados especificados en la *Tabla 5*, con mezclas de reacción y condiciones de amplificación específicas para cada fragmento a obtener, detallados en el anexo 3. La clonación del gen mutado en las posiciones 47/51 y A328/330 se realizó de la misma manera en el vector pET28a. Los resultados de secuenciación obtenidos de la construcción de la biblioteca acotada se muestran en la *Figura 36* y *Figura 37*.

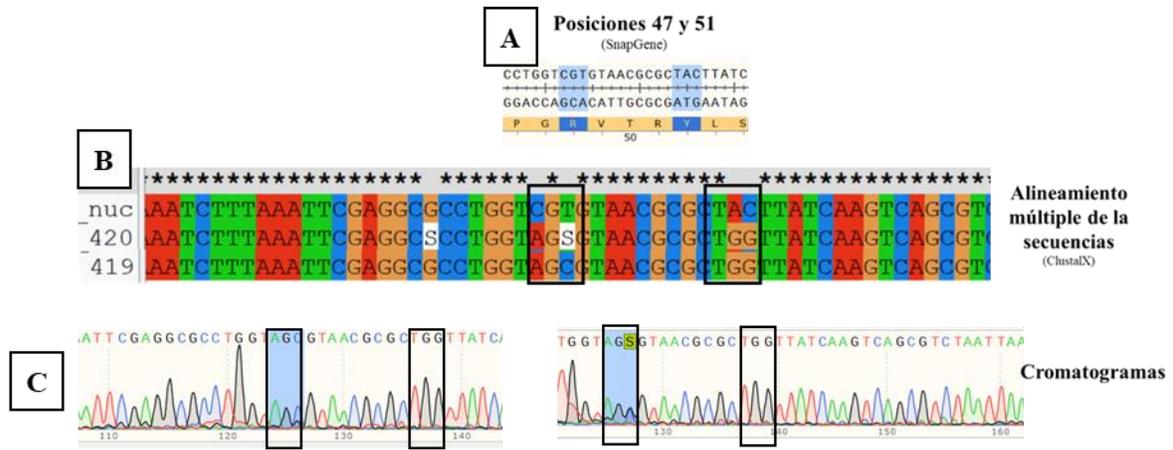


Figura 36. Mutaciones en las posiciones 47 y 51 confirmadas por secuenciación.

(A) Codones silvestres en 47 y 51 del P430_{BM3}, visualizado en SnapGene. (B) Alineamiento de secuencias de DNA del P430_{BM3} WT vs. las secuencias provenientes de los plásmidos secuenciados. (C) Cromatogramas donde se observa el cambio de secuencia en los codones correspondientes.

Mediante el análisis de las secuencias obtenidas del ADN plasmídico, se observaron tanto cambios individuales como mezclas de nucleótidos sobre las posiciones 47/51 y 328/330, que son identificados fácilmente en los cromatogramas mostrados.

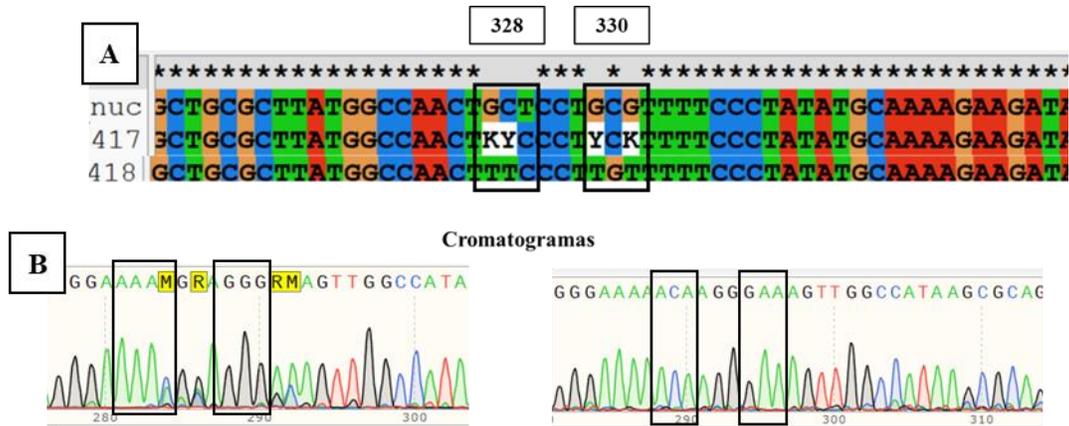


Figura 37. Mutaciones en la posición 328 y 330 confirmadas por secuenciación.

(A) Alineamiento de secuencias de DNA del P430_{BM3} WT vs las secuencias provenientes de los plásmidos secuenciados. (B) Cromatogramas donde se observa el cambio de secuencia en los codones correspondientes.

Confirmados los cambios en las posiciones y descartando mutaciones espurias, se aisló el ADN plasmídico de la biblioteca construida, el cual fue empleado para el proceso de tamizaje siguiente.

6.4.3 Tamizaje de la biblioteca acotada

Antes de iniciar el proceso de tamizaje de la biblioteca acotada, se aseguró la presencia del P450_{BM3} bajo las condiciones de crecimiento e inducción empleadas en las cajas de cultivo de 1 mL. Se comparó la expresión del P450_{BM3} construido en el vector pET28a con el gen clonado en el vector pCWori, utilizado principalmente por su optimización en la expresión de P450s (Barnes, 1996). Para este propósito, se realizó un análisis mediante SDS-PAGE, donde se cargaron muestras de lisado celular obtenidas por sonicación y por el método de lisis enzimática utilizado en las cajas de cultivo de 96 pozos. observaron bandas de 119 kDa correspondientes al P450_{BM3}, presentes en ambos vectores (ver *Figura 38*).

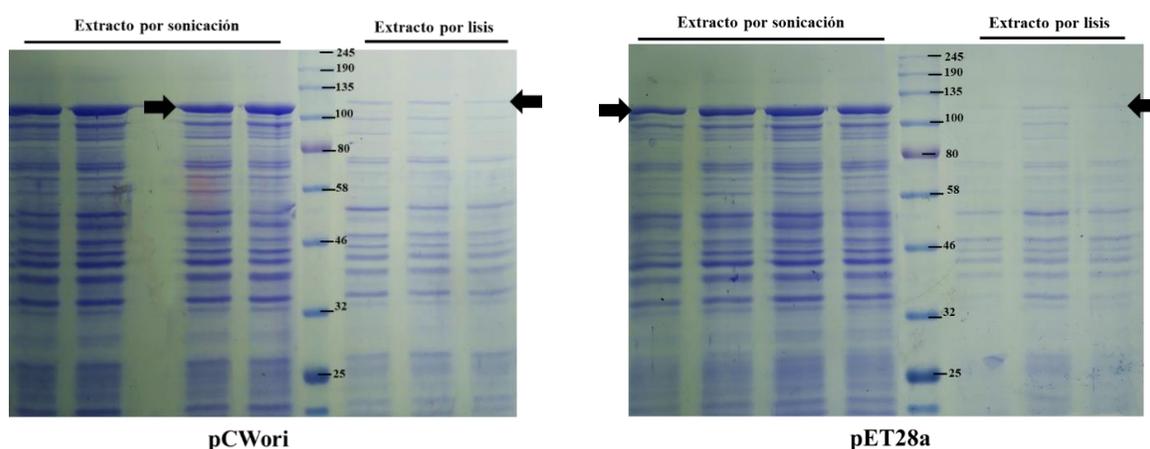
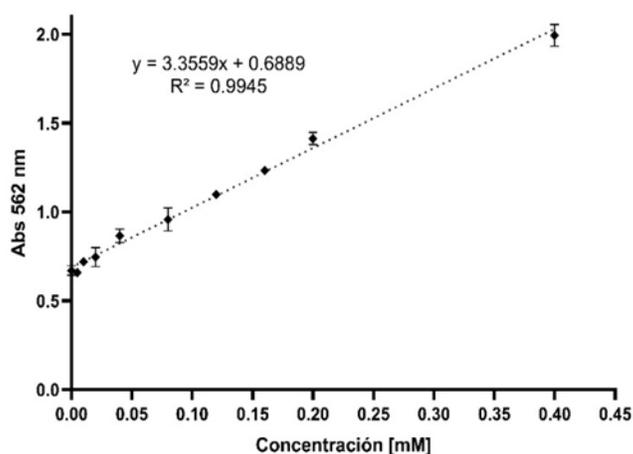


Figura 38. SDS-PAGE de pCWori y pET28a.

Se muestran los geles del P450_{BM3} clonado en los vectores pCWori y pET28a. Las flechas indican la banda correspondiente al P450_{BM3} de 119.5 kDa. (M) Marcador de peso molecular. Los carriles contienen muestras al azar de extractos proteicos provenientes por sonicación y lisis enzimática.

Una vez que se determinó que la proteína estuviera sobreexpresada bajo las condiciones a trabajar, se continuó con el proceso de tamizaje de la librería acotada.



0.5991	0.6255	0.6304
0.6163	0.6099	0.6103
0.6256	0.6765	0.6406
0.6126	0.6507	0.6645

Figura 39. Curva estándar de ácido cafeico y Abs a $\lambda=562\text{nm}$ del P450_{BM3} WT. **(Izquierda)** Curva estándar de ácido cafeico de 0 a 0.4 mM en una mezcla con lisado celular, NADPH y buffer KPi + ácido p-cumárico 0.4 mM. **(Derecha)** Se muestran valores de absorbancia de 12 muestras al azar de P450_{BM3} WT, obteniendo un promedio de 0.63 ± 0.0473 .

La librería generada del P450_{BM3} con mutaciones en 47, 51, 328 y 330, abarca aproximadamente 300 variantes a nivel de nucleótido y 160 a nivel de proteína. En consecuencia, se decidió tamizar 480 variantes mediante el ensayo de Fe(III)-FZ.

Las variantes se analizaron individualmente en cajas de cultivo de 96 pozos y se seleccionaron aquellas que mostraron mayores valores de absorbancia con respecto al P450_{BM3} WT (ver **Figura 40**). El criterio de selección fue un valor de Abs > 0.6775, ya que el promedio \pm SD obtenido con la WT fue de 0.6301 ± 0.0473 (ver **Figura 39**).

Con base en los anteriores criterios, se seleccionaron un total de 54 clonas: 18 con valores superiores a 0.6775, 18 con valores intermedios entre 0.55-0.65 y 18 con valores inferiores a 0.5. Estas clonas se sometieron a un segundo tamizaje y se volvieron a seleccionar aquellas que mostraron el fenotipo deseado.

Los resultados del segundo tamizaje revelaron que algunas variantes no pudieron repetir la característica por la cual fueron seleccionadas inicialmente. Sin embargo, dentro de las 54 variantes, se seleccionaron 4 que mostraron nuevamente valores de absorbancia más altos y 4 con los valores más bajos (ver *Figura 40*). Se llevó a cabo un análisis del perfil de los productos de reacción mediante TLC para intentar relacionar los productos generados con los cambios en observados en la absorbancia.

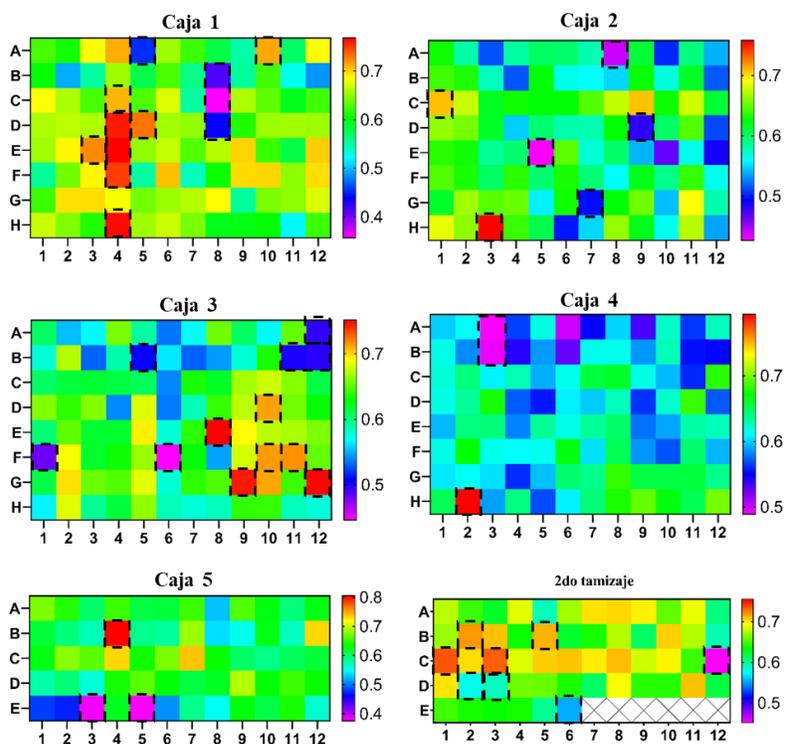


Figura 40. Tamizaje de la librería 47/51/328/330.

Se muestra el mapa de color en función del valor de absorbancia obtenido por el ensayo de Fe(III)-FZ. Las variantes seleccionadas se encuentran dentro de un marco punteado. Las cajas 1 a la 5 son resultados del primer tamizaje.

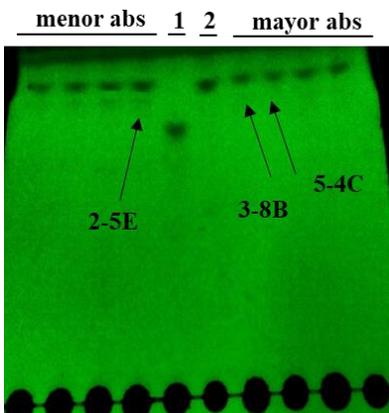


Figura 41. TLC de las variantes seleccionadas.

(1) P450WT + ácido cafeico 0.4mM. (2) P450WT + ácido *p*-cumárico 0.4 mM. A la izquierda se colocaron muestras de variantes que mostraron menor absorbancia, a la derecha aquellas con mayor absorbancia. Se aprecian bandas con FR diferentes a los controles. Fase móvil de cloroformo:metanol:ácido fórmico (85:15:1).

Inesperadamente, durante el ensayo por TLC, se identificaron bandas con factor de retención diferente a los controles (ácido *p*-cumárico y ácido cafeico) en las muestras provenientes de las clonas que presentaron los valores más bajos de absorbancia en el ensayo con Fe(III)-FZ (**Figura 41**), cuando en términos reales se esperaba ver la formación de un producto en muestras provenientes de variantes con las absorbancias más altas, que querían decir que la formación de color se presentó por la formación de un producto. Para esto último, no se observaron bandas, por lo que fueron considerados como falsos positivos. De las variantes muestreadas que repitieron el fenotipo y que mostraron bandas en la TLC, se seleccionaron la 2-5E, 3-8B y 5-4C para su secuenciación y para determinar los cambios en la secuencia de aminoácidos, los cuales se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Cambios en la secuencia de aminoácidos de las variantes 2-5E, 3-8B y 5-4C.

Variante seleccionada	Residuo de aminoácido			
	47	51	328	330
2-5E	R	W	V	A
3-8B	S	W	V	L
5-4C	R	W	A	R

En negritas se encuentran los aminoácidos silvestres (sin cambios)

Los resultados de secuenciación destacan la presión de selección por triptófano (W) en la posición 51, mientras que para las demás posiciones se observó variabilidad, especialmente en 330, donde se encontraron cambios a tres aminoácidos diferentes. En la posición 47, se observaron los dos cambios esperados, y en la 328, el aminoácido silvestre se mantuvo en dos de las tres variantes muestreadas. A pesar de haber caracterizado solo tres variantes, se pudo observar la combinatoria de mutaciones en las cuatro posiciones trabajadas.

De esta manera, se identificaron y seleccionaron para expresión y purificación las variantes 3-8B, 3-11B y 5-4C del P450_{BM3}, que en el tamizaje de alta eficiencia mostraron mayores valores de absorbancia en comparación con la silvestre. Además, se seleccionó la variante 2-5E, la cual en el ensayo por TLC mostró productos de reacción con RF diferentes al ácido *p*-cumárico, con el fin de comparar su actividad frente al P450_{BM3} WT en presencia del sustrato natural (estearato) y del ácido *p*-cumárico.

6.5 Expresión y purificación de las variantes seleccionadas

Durante el proceso de purificación tanto del P450_{BM3} como de la variante 2-5E en el que se recolectaron fracciones, se observó en el gel de SDS-PAGE que la variante 2-5E se sobreexpresó en mayor cantidad que el P450_{BM3} WT (*Figura 42*).

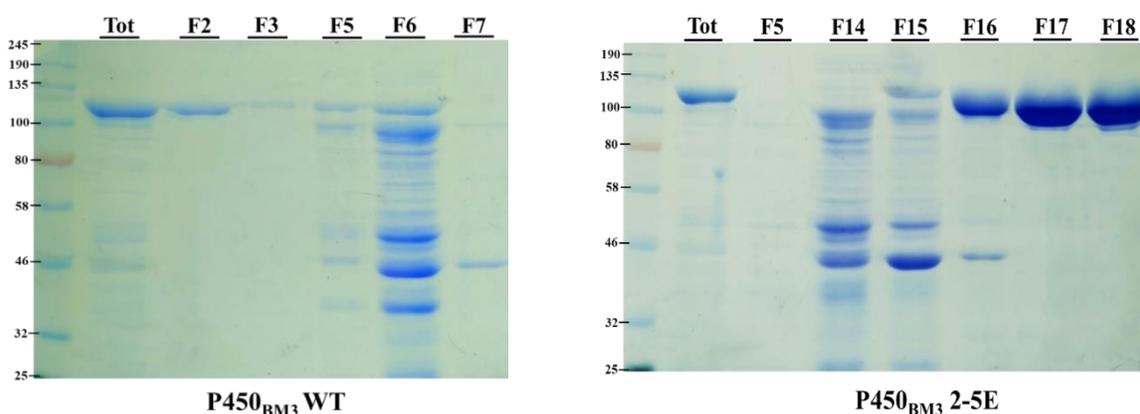


Figura 42. SDS-PAGE del proceso de purificación del P450_{BM3} y la variante 2-5E. **Tot:** fracción con la proteína total. **F1-18:** representa las fracciones colectadas durante el proceso de elución de una columna de afinidad a Níquel en FPLC. El P450_{WT} eluyó en las primeras fracciones, la variante 2-5E eluyó posterior a la fracción 16.

Una vez obtenidas las proteínas puras, se realizaron ensayos de actividad monitorizando el consumo de NADPH a $\lambda=340$ nm en presencia de dos sustratos conocidos por ser hidroxilados por el P450_{BM3}: el estearato (C₁₈H₃₆O₂) y el SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) (Tsotsou *et al.*, 2002). Al obtener la cinética de consumo durante 12 min, se observó lo siguiente: el P450_{BM3} WT mostró una mayor velocidad de consumo en presencia de SDS que en presencia de estearato (**Figura 43A**). Esto sugiere que el P450_{BM3} tiene preferencia por sustratos con cadenas hidrocarbonadas más cortas (12 carbonos) en contraste con aquellas que contienen una mayor cantidad de carbonos, como el estearato (18 carbonos). Otra posible razón puede ser a que el SDS contiene una región hidrofílica más polar que la región carboxilato del estearato, lo cual facilitaría una unión más efectiva en las regiones de Y51 y Ser72 (Zilly *et al.*, 2011).

En contraste, la variante 2-5E mostró una disminución en la velocidad de consumo de NADPH en presencia de ambos sustratos en comparación con el P450_{WT}. Un hallazgo interesante fue que la variante 2-5E presentó una menor velocidad de consumo del NADPH con el SDS que con el estearato, es decir, un comportamiento inverso al del P450_{WT} (**Figura 43B**). Esta particularidad podría atribuirse a la mutación Y51W que presenta la variante 2-5E, la cual se ha asociado con una reducción en la interacción con la porción carboxilato de los ácidos grasos, dado que la formación de un puente de hidrógeno con la tirosina se ve eliminada (Zilly *et al.*, 2011). La sustitución por triptófano podría afectar esta interacción, reduciendo así la reacción de hidroxilación sobre ácidos grasos como el estearato.

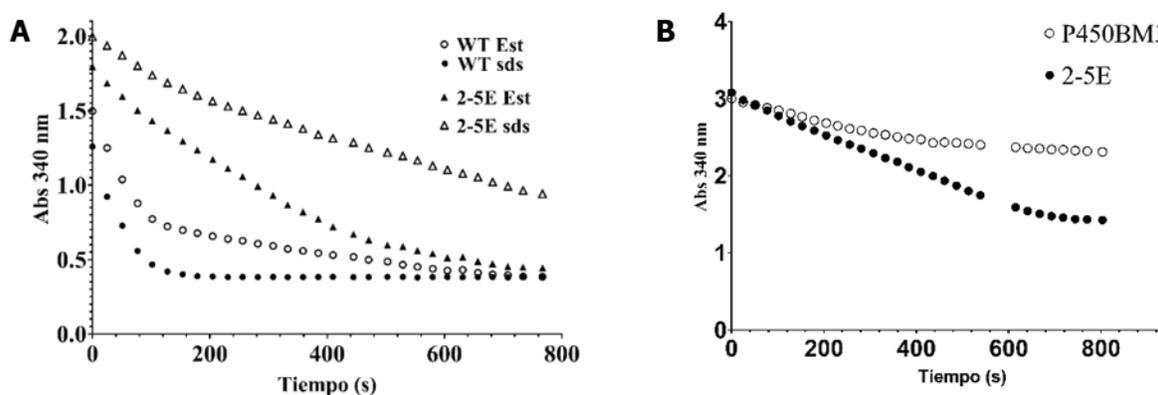


Figura 43. Gráficas de consumo de NADPH. Se compara el consumo de NADPH del P450_{BM3} WT y de la variante 2-5E. (A) En presencia de SDS, estearato y (B) ácido *p*-cumárico.

Por otro lado, se observó un comportamiento inverso entre el consumo de NADPH del P450_{BM3} WT y de la variante 2-5E en presencia de ácido *p*-cumárico, en contraste con lo observado con los sustratos naturales. Esto resultó interesante, por lo que se procedió a realizar un ensayo en TLC para examinar el perfil de los productos en caso de haberse utilizado el ácido *p*-cumárico como sustrato. Sin embargo, los resultados de la TLC no mostraron la presencia de un producto diferente al ácido *p*-cumárico, ni tampoco uno similar al ácido cafeico (*Figura 44*).

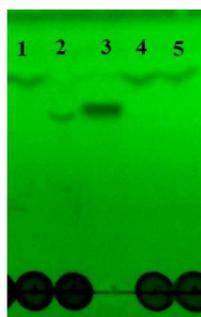


Figura 44. TLC del P450_{BM3} y 2-5E.
(1) WT + ac. *p*-cumárico. (2) WT + ac. cafeico. (3) Estándar de ac. cafeico. (4) y (5) 2-5E + ac. cumárico. Fase móvil de cloroformo:metanol:ácido fórmico 85:15:1.

6.6 Espectro absoluto de las proteínas purificadas

El citocromo P450 exhibe características espectroscópicas derivadas de su grupo hemo, incluyendo una pequeña banda de absorción en 650 nm, bandas α y β de absorción a 570 y 535 nm respectivamente, y la banda Soret (o banda γ) a 418 nm cuando el hemo está en un estado de bajo espín. En presencia de ciertos sustratos o al aumentar la temperatura de la solución, la proporción de hemoproteína de alto espín aumenta, lo que se traduce en un incremento en la absorbancia a 395 nm (Schekman y Jansson, 2006). Por lo tanto, una vez obtenidas las proteínas puras, se procedió a analizar estas características mediante el escaneo de la región de 250 nm a 700 nm para obtener el espectro absoluto del P450_{BM3}WT y sus variantes, que se muestra en la *Figura 45*.

Con base en los datos obtenidos del espectro absoluto de las proteínas purificadas, se determinó el factor Rz. De acuerdo con la *Tabla 7* se observa que el P450_{BM3}WT exhibió el factor Rz más bajo, lo que sugiere una menor cantidad de hemoproteína. En contraste, la variante 54C mostró el valor más alto de Rz, indicando una mayor concentración de hemoproteína por proteína purificada. Es posible que un factor Rz mayor pueda lograrse mediante la adición de cloruro de hemina al medio de cultivo, o bien, utilizando precursores del hemo como el ácido γ -aminolevulínico durante la sobreexpresión. Sin embargo con las condiciones de cultivo, tiempo de crecimiento, concentración de IPTG y la temperatura ensayada, fue posible obtener concentraciones adecuadas de P450. Por lo tanto, consideró la concentración de proteína con hemo para realizar los ensayos de unión a sustratos y para obtener los espectros de diferencia, que sirve para conocer de forma más adecuada la cantidad de proteína que contiene el grupo hemo y con ello realizar cálculos específicos para ensayos de unión a sustratos y de actividad enzimática.

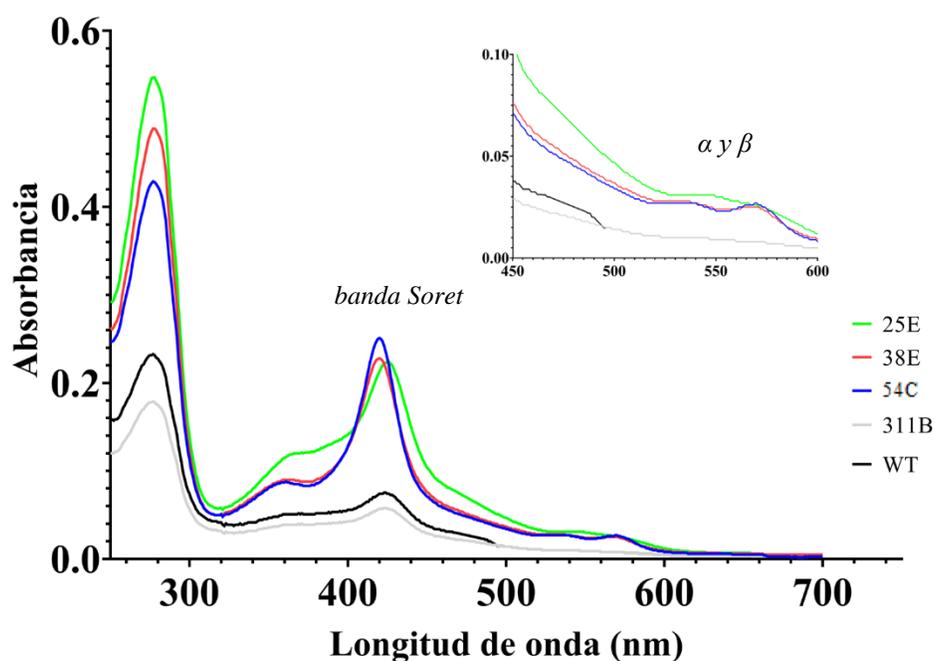


Figura 45. Espectro absoluto del P450_{BM3}WT y las variantes purificadas. Se logra apreciar la banda Soret a 418 nm, indicativo del estado de bajo spin y las bandas α y β . La banda a 650 nm no fue detectable a las concentraciones ensayadas. La gráfica en la parte superior derecha es una amplificación de la región 500-600 nm, donde se observan las bandas α y β .

De acuerdo con la **Tabla 7**, se observa que el P450_{BM3}WT exhibió el factor Rz más bajo, lo que sugiere una menor cantidad de hemoproteína. En contraste, la variante 54C mostró el valor más alto de Rz, indicando una mayor concentración de hemoproteína por proteína purificada. Es posible que un factor Rz mayor pueda lograrse mediante la adición de cloruro de hemina al medio de cultivo, o bien, utilizando precursores del hemo como el ácido γ -aminolevulínico durante la sobreexpresión. Sin embargo con las condiciones de cultivo, tiempo de crecimiento, concentración de IPTG y la temperatura ensayada, fue posible obtener concentraciones adecuadas de P450. Por lo tanto, consideró la concentración de proteína con hemo para realizar los ensayos de unión a sustratos y para obtener los espectros de diferencia.

Tabla 7. Concentración de las proteínas purificadas y su factor Rz.

Proteína	A _{418nm}	A _{280nm}	Rz	Concentración de P450 con hemo (μ M)	Concentración proteína total (μ M)	Pureza del P450 %
WT	0.071	0.227	0.31	59	67	88
25E	0.205	0.539	0.38	72	81	88
311B	0.052	0.175	0.29	27	30	90
38E	0.226	0.483	0.46	89	98	90.8
54C	0.247	0.423	0.58	111	119	93

6.7 Diferencia espectral de unión a sustratos

Dado que se observó que una de las variantes, como la 2-5E, presentan consumo de NADPH en presencia de ácido *p*-cumárico, se decidió analizar la posible interacción de este compuesto mediante los cambios espectrales que pudieran generarse en el grupo hemo. Respecto a la interacción entre los P450 y un ligando, se conocen dos tipos de cambios espectrales distintivos en el espectro UV/Vis de la banda Soret, conocidos como tipo I y tipo II. En el cambio de tipo I, el desplazamiento del agua unida al hierro del hemo resulta en un pico aproximado a 390 nm, acompañado por una disminución a 418 nm. Por otro lado, el cambio tipo II se produce cuando un ligando se coordina directamente con el hierro del hemo, mostrando una alteración en la región de 430-450 nm. Sin embargo, los ligandos que provocan este cambio suelen ser inhibidores y generalmente no se unen de manera que puedan ser sujetos a catálisis (Isin y Guengerich, 2008).

A partir de esto, se obtuvieron los cambios en el espectro de la región Soret cuando se adicionaron SDS y ácido *p*-cumárico como sustratos al P450_{BM3}WT y las variantes purificadas, cuyos resultados que se muestran a continuación.

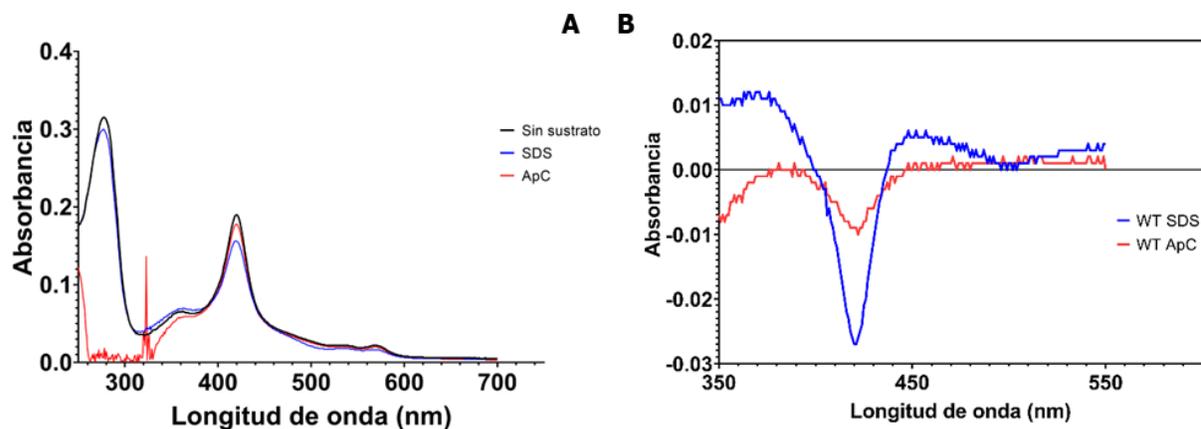


Figura 46. Espectro de absorbancia y diferencia espectral en presencia y ausencia de sustratos del P450_{BM3}WT. (A) Espectro UV/Vis en ausencia y presencia de SDS y ácido *p*-cumárico (ApC). (B) Diferencia espectral inducida por la interacción con SDS y ApC.

Al observar la **Figura 46**, que representa la diferencia espectral del P450_{BM3}WT en presencia de sustratos, se aprecia que el SDS induce un cambio de tipo I en el espectro, indicando una interacción cercana al hemo. Por otro lado, en presencia del ácido *p*-cumárico, estos cambios son menos evidentes, posiblemente debido a que es un sustrato incapaz de ingresar al bolsillo catalítico. Además, durante la obtención del espectro en presencia de ácido *p*-cumárico, se observó un ruido indeterminado en la región de 250 a 350 nm, que es característicos de compuestos fenólicos, principalmente por su estructura química compuesta por un núcleo fenólico y una cadena lineal insaturada que es estabilizada por resonancia.

En el análisis de la interacción de los sustratos con la variante 2-5E (**Figura 47**) se obtuvo un comportamiento opuesto al del P450_{BM3}WT, particularmente en presencia de ácido *p*-cumárico, ya que mostró un comportamiento similar a la interacción con un sustrato natural, generando un cambio espectral de tipo I que, si bien no es tan intenso como el que produce el SDS con el P450_{BM3}WT, fue mayor que el generado por el sustrato natural.

El comportamiento exhibido por la variante 2-5E podría estar correlacionado con el consumo de NADPH mostrado anteriormente. Dado que no se ha logrado detectar algún compuesto producto de la hidroxilación del ácido *p*-cumárico, es posible que la interacción

esté generando un desacoplamiento en la transferencia de electrones del NADPH al sitio activo.

Además, se ha demostrado que en algunos P450 el sustrato llega a unirse y/o disociarse en otros pasos del ciclo catalítico, cuando normalmente la unión del sustrato tiene lugar antes de la reducción del hierro del hemo (Isin y Guengerich, 2006). Otra razón podría ser la posibilidad de que exista otro sitio de unión que interactúe con el ácido *p*-cumárico y que no necesariamente sea en el dominio catalítico si no en la región reductasa del P450_{BM3}, aunque los cambios espectrales sugieran que se esté uniendo cerca del sitio activo. Así mismo, es posible que la reacción sea muy lenta y los métodos utilizados hasta ahora no hayan permitido la detección de producto.

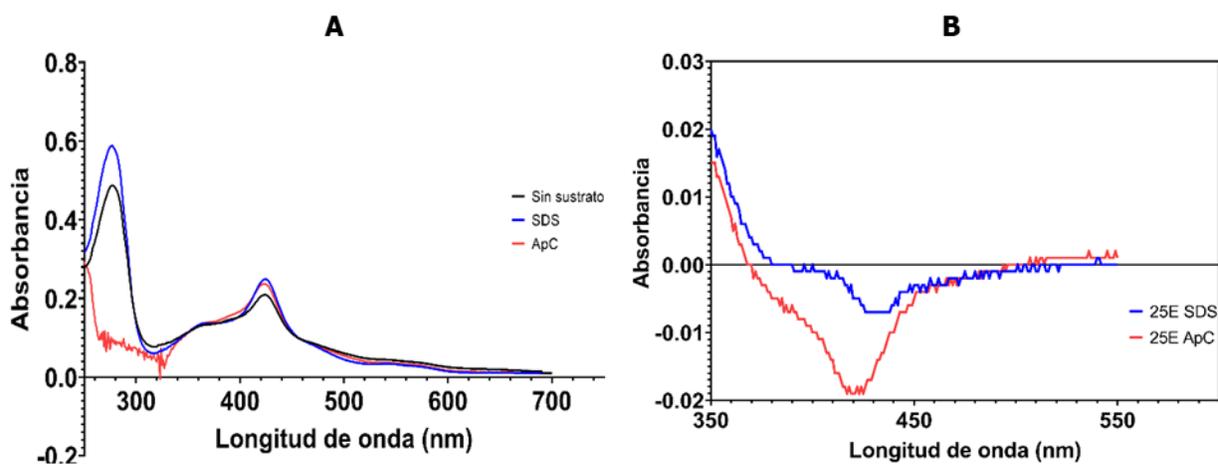


Figura 47. Espectro de absorbancia y diferencia espectral en presencia y ausencia de sustratos de la variante 25E.

(A) Espectro UV/Vis en ausencia y presencia de SDS y ácido *p*-cumárico (ApC). (B) Diferencia espectral inducida por la interacción con SDS y ApC.

6.8 Tercera ronda de construcción de bibliotecas

Las variantes seleccionadas de la librería acotada, 3-8B, 3-11B y 5-4C, fueron purificaron posteriormente. Aunque aún no se ha caracterizado su actividad de la misma manera que la 2-5E, presentan mutaciones en las posiciones 47, 51, 328 y 330. Además, mostraron la característica de consumir NADPH en presencia de ácido *p*-cumárico y exhibieron pérdida de coloración en el tamizaje con Fe(III)-FZ. Por lo tanto, se decidió utilizar el DNA plasmídico de estas variantes como templado para generar una tercera librería, explorando las mutaciones originalmente propuestas en las posiciones 82, 87 y 438. El proceso empleado para la generación de esta biblioteca se encuentra en el anexo 3.1.

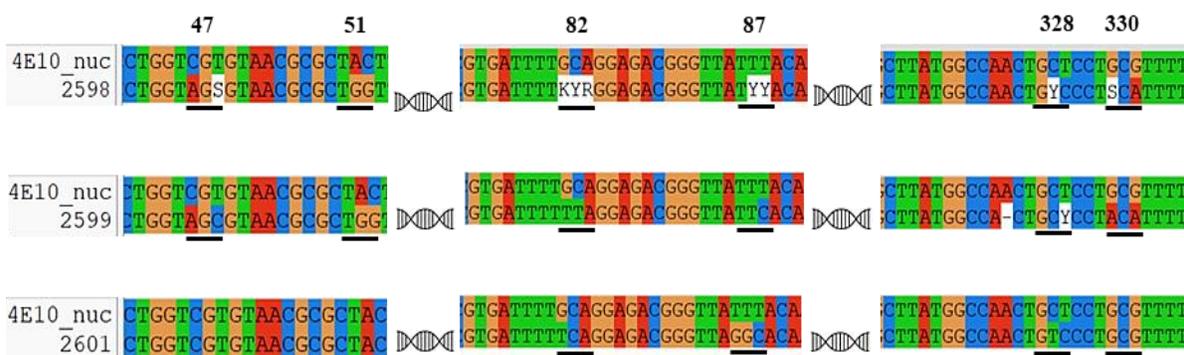


Figura 48. Mutaciones en las posiciones 47/51/82/87/328/330 confirmadas por secuenciación.

La secuencia 2598 proveniente de un pool de colonias muestra mezcla de nucleótidos en algunas posiciones, mientras que las secuencias 2599 y 2601 presentan un solo cambio dado que provienen de colonias individuales.

La construcción de la biblioteca utilizando el DNA templado proveniente de las variantes seleccionadas se realizó de manera similar a la metodología descrita en la sección 5.9. Una vez obtenidas las colonias con la combinatoria de mutantes, se seleccionaron algunas de forma individual y se formaron pools para su secuenciación. Los resultados de secuenciación, como se muestran la **Figura 48**, revelaron que se mantuvieron las mutaciones en las posiciones 47/51/328/330 y se logró adicionar las esperadas en las posiciones 82/87.

Una vez confirmadas los cambios adicionales en las posiciones 82/87 y descartadas las mutaciones espurias, se aisló el ADN plasmídico de la biblioteca construida para ser transformado en células de *E. coli* y expresar las variantes para su tamizaje.

6.8.1 Tamizaje de la biblioteca construida sobre las variantes

La librería construida del P450_{BM3}, que incluye mutaciones en las posiciones 47, 51, 82, 87, 328, 330 y 438, consta de 10,300 variantes a nivel de nucleótidos y 4,990 a nivel de proteínas. Se ha realizado un tamizaje preliminar de cerca de 1,150 variantes individuales de esta librería. El análisis de estas variantes se manejó de la misma manera con el ensayo de Fe(III)-FZ, donde se obtuvieron las absorbancias y se seleccionaron aquellas clonas con valores más altos de absorbancia y aquellas que mostraron la característica de pérdida de coloración.

En el anexo 4 se muestran los mapas de calor que representan los valores de absorbancia. De las cajas 1 a la 6, se reselectaron 30 clonas para un segundo tamizaje con Fe(III)-FZ. De estas clonas, se identificaron las variantes 1-5F, 1-11G, 2-1A y 2-8C que mostraron menor absorbancia, evidenciando pérdida de coloración en las MTPs. Por otro lado, las variantes 3-7G, 6-5E, 6-10G y 6-10H exhibieron valores más altos de absorbancia. Estas variantes se conservan en glicerol/LB a -70°C para análisis posteriores.

En las cajas 7 a la 12, se identificaron y seleccionaron 30 variantes con los valores más altos de absorbancia y 37 que presentaron pérdida de coloración, correspondiendo a valores más bajos de absorbancia. Estas clonas también se sometieron a un segundo tamizado. De estas, las clonas de los pozos 7-9C, 8-1B, 9-9H, 10-6D y 12-3F volvieron a mostrar datos más altos de absorbancia, mientras que las clonas 7-2A, 8-11H, 9-2H, 11-2H y 12-3B repitieron la pérdida de coloración.

Las variantes que mostraron consistentemente mayores o menores valores de absorbancia en el segundo tamizado se seleccionaron para un ensayo de actividad. Este ensayo midió el consumo de NADPH, variando la adición de ácido *p*-cumárico al medio de reacción. En general, los resultados de este ensayo no mostraron actividad en las variantes seleccionadas durante el tiempo de monitoreo de 12 minutos. Sin embargo, se obtuvieron datos de absorbancia mediante el método con Fe(III)-FZ después de 12 horas de reacción.

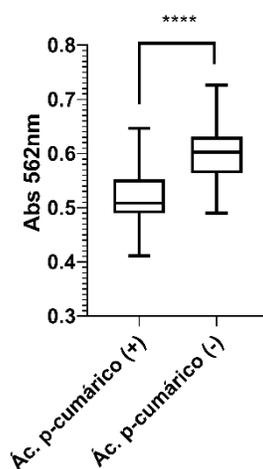


Figura 49. Abs a $\lambda=562$ nm de grupos de variantes con o sin sustrato. Los resultados de la prueba t-student muestran diferencias significativas ($p<0.0001$).

Los datos recopilados se organizaron y compararon en función de la presencia o ausencia del ácido *p*-cumárico como sustrato. En conjunto, las variantes que tuvieron sustrato en el medio exhibieron absorbancias más bajas en comparación con las mismas variantes en ausencia de sustrato (**Figura 49**). Inicialmente, se determinó que el NADPH contribuye a la señal de absorbancia en el método de Fe(III)-FZ, lo que explica los valores más bajos observados, ya que las variantes están consumiendo NADPH en presencia del ácido *p*-cumárico durante el periodo de reacción de 12 horas antes del tamizaje.

Dado que la característica de que algunas variantes consumen el NADPH y generan la pérdida de coloración en el método de Fe(III)-FZ, se continúan realizando ensayos de TLC para identificar posibles productos en caso de haber utilizado el ácido *p*-cumárico como sustrato. Si bien en algunos casos los resultados de las TLC no han mostrado la presencia de un producto diferente al ácido *p*-cumárico ni tampoco similar al ácido cafeico, en otros, como se muestra en la **Figura 41** se pueden apreciar ligeras bandas por debajo de la que corresponde al ácido *p*-cumárico. Por lo tanto, se plantea la posibilidad de identificar estos productos mediante un método más sensible, como HPLC acoplado a espectrometría de masas.

7. CONCLUSIONES

Se estableció el ensayo de Fe(III)-FZ como método de tamizaje para identificar las variantes que estén utilizando ácido *p*-cumárico como sustrato, ya que demostró mayor sensibilidad para detectar la presencia de ácido cafeico, un rango lineal más amplio y una menor desviación estándar.

La primera fase de construcción de biblioteca de variantes, combinando mutaciones en las posiciones 42, 82, 87, 328, 330 y 438, según lo propuesto por Jorge Jiménez, resultó en la creación de 26,000 variantes. A pesar de haber analizado 900 colonias y seleccionado 5 variantes, los ensayos de TLC no mostraron evidencia de producción significativa de ácido cafeico. Para una exploración completa y concluyente, es necesario la optimización en los esfuerzos de selección.

El enfoque que incluyó las mutaciones Y51W y A330F propuestas por un análisis teórico, permitió la generación y exploración completa de una biblioteca más reducida, compuesta por 300 variantes, identificando las variantes 2-5E, 3-8B y 5-4C que exhibieron características que no se presentaron en la primera etapa.

La creación de una tercera biblioteca con cerca de 10,000 variantes a partir de las variantes 2-5E, 3-8B y 5-4C, y adicionando mutaciones en las posiciones 82/87 y 438, permitió identificar variantes con características prometedoras que sugieren cambios en la actividad enzimática en presencia de ácido *p*-cumárico, sin embargo no se ha logrado identificar un producto de reacción.

La caracterización espectroscópica de las variantes 2-5E, 3-8B, 3-11B y 5-4C reveló cambios espectrales al adicionar SDS y ácido *p*-cumárico como sustrato, lo que sugiere una interacción del ácido *p*-cumárico con la región cercana al grupo hemo de la enzima.

Estos resultados ofrecen perspectivas interesantes para continuar refinando la estrategia de mutagénesis y de cómo optimizar el proceso de selección de variantes con la capacidad deseada para hidroxilar ácido *p*-cumárico.

8. PERSPECTIVAS

- Continuar con el proceso de tamizaje a profundidad de las bibliotecas generadas.
- Seguir con el análisis de las variantes seleccionadas, que mostraron un perfil de productos interesante, mediante su expresión y purificación individual.
- Refinar la estrategia de construcción de biblioteca de variantes optimizando el número de variantes a explorar, partiendo de variantes prometedoras identificadas en trabajos previos.
- Explorar mutaciones adicionales en las posiciones críticas del canal de acceso al sustrato que no han sido incluidas.

9. ANEXOS

ANEXO 1. Obtención de productos de PCR para la construcción de la biblioteca de variantes

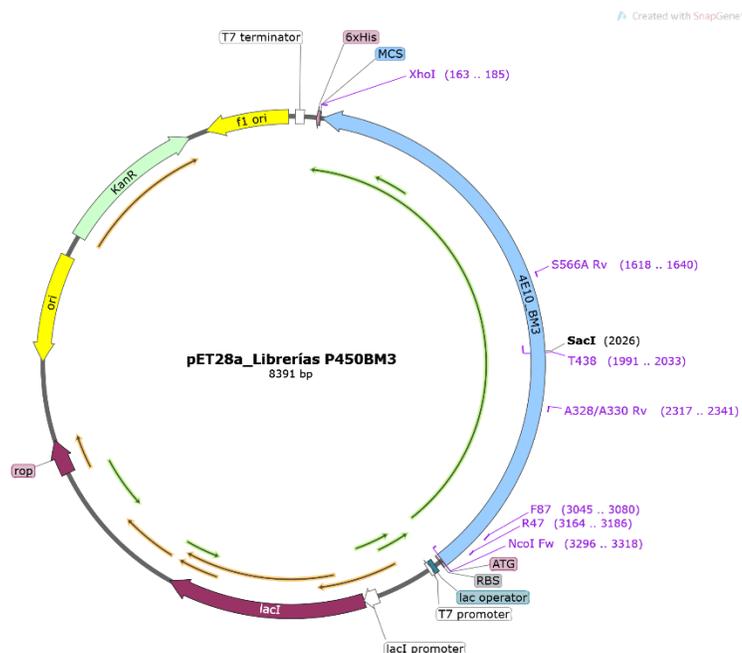


Figura 50. Plásmido pET28a.

Se muestra el plásmido empleado para la construcción de las variantes, contiene la inserción del gen del P450_{BM3}, donde se muestra la ubicación de los sitios de corte y los oligos empleados.

➤ Obtención de fragmento T438/XhoI (1877 pb)

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN templado (100 ng/uL)	4
Oligo Forward (T438)	4
Oligo Reverse (XhoI)	4
ddH ₂ O	63

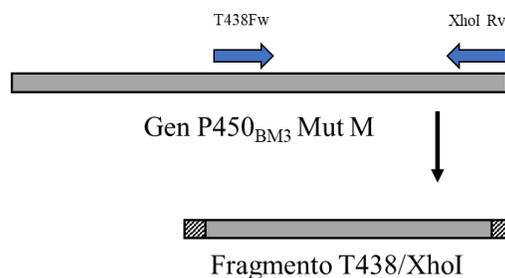


Figura 51. Obtención de fragmento T438/XhoI.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 25 ciclos, cada uno con etapas de 94 °C por 30 s, 55°C por 30 s, 68°C por 1 min 10 s; seguidos de un ciclo de extensión final de 68 °C de 5 min.

➤ Obtención de *megaprimer* NcoI/R47 (161 pb)

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN templado (100 ng/μL)	4
Oligo Forward (NcoI) 10 pmol	5
Oligo Reverse (R47) 10 pmol	5
ddH ₂ O	61

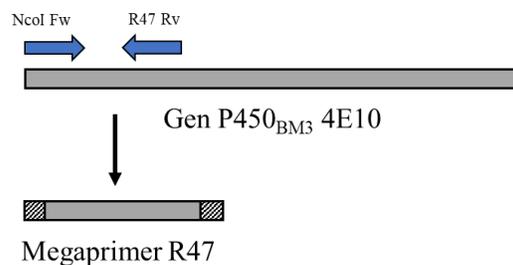


Figura 52. Obtención de megaprimer NcoI/R47.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 25 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 68°C por 30s; seguidos de un ciclo de extensión final de 68°C de 3 min.

➤ Obtención de fragmento NcoI/R47/82/87 (280 pb)

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN templado (100 ng/μL)	4
Megaprimer R47 (96ng/μL)	4
Oligo Reverse (F82/87) (equimolar a megaprimer)	1
ddH ₂ O	66

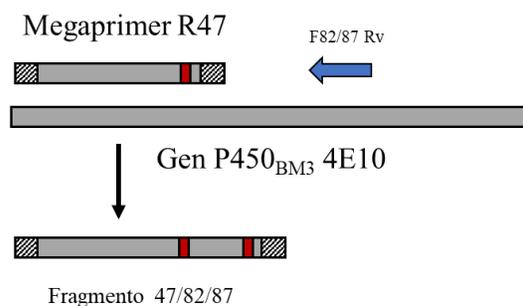


Figura 53. Obtención de fragmento NcoI/R47/82/87.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 27 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 30 s, 57°C por 45 s, 68°C por 30 s; seguidos de un ciclo de extensión final de 68°C de 5 min.

➤ Extensión de 47/82/87 posterior a SacI (1700 pb)

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN templado (100 ng/μL)	4
Megaprimero 47/82/87 (74ng/μL)	10
Oligo Reverse (S566Rv) (equimolar a megaprimero)	1
ddH ₂ O	60

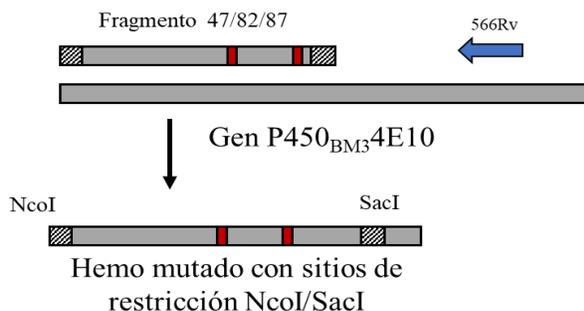


Figura 54. Obtención de fragmento NcoI/R47/82/87 posterior a SacI.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 30s, 58°C por 45s, 68°C por 1 min 45s; seguidos de un ciclo de extensión final de 68°C de 8 min.

➤ Obtención de fragmento NcoI/A328/330 (1008 pb)

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN plasmídico con mutaciones en 47/82/87 (100 ng/μL)	5
Oligo Forward (NcoI Fw) 10 pmol	5
Oligo Reverse (A328/330) 10 pmol	5
ddH ₂ O	60

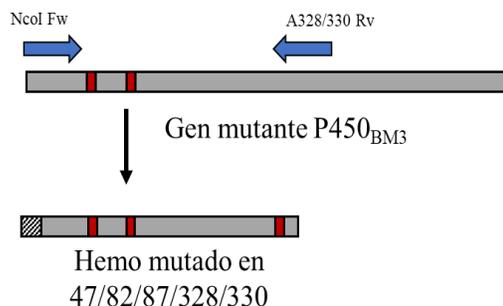


Figura 55. Obtención de fragmento NcoI/A328/330.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 27 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 30s, 54°C por 30s, 68°C por 1 min; seguidos de un ciclo de extensión final de 68°C de 5 min.

➤ Extensión de megaprimer NcoI/A328/330 posterior a SacI (1700 pb)

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN plasmídico con mutaciones en 47/82/87 (100 ng/μL)	5
Megaprimer NcoI/A328/330 (50ng/μL)	25
Oligo S566Rv (equimolar a megaprimer)	1
ddH ₂ O	60

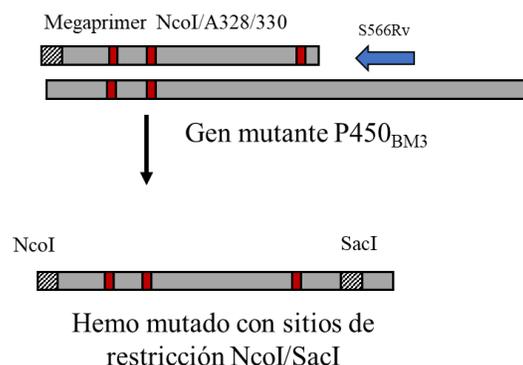


Figura 56. Extensión de megaprimer posterior a SacI.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 32 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 30s, 60°C por 45s, 68°C por 1 min 45s; seguidos de un ciclo de extensión final de 68°C de 8 min.

Tabla 8. Combinatoria de aminoácidos obtenida de los oligonucleótidos empleados.

Posición	Oligo	Cadena molde	Codones molde	Codones codificantes	Aminoácidos	No. de codones	No. de a.a.	Combinatoria nucleótidos	Combinatoria a.a.
R47	SCT	TCS	TCC TCG	AGG AGC	AGG=R AGC=S	2	2	2	2
A82	TRM	MRT (A/C)(A/G)T	AAT AGT CAT CGT	TTA TCA GTA GCA	TTA=L TCA=S GTA=V GCA=A	4	4	8	8
F87	SVM	MVS (A/C)(A/C/G)(C/G)	AAC AAG ACC ACG AGC AGG CAC CAG CCC CCG CGC CGG	TTG TTC TGG TGC TCG TCC GTG GTC GGG GGC GCG GCC	TTG=L TTC=F TGG=W TGC=C TCG=S TCC=S GTG=V GTC=V GGG=G GGC=G GCG=A GCC=A	12	8	192	64
A328	GRM	MRG (A/C)(A/G)G	AAG AGG CAG CGG	TTC TCC GTC GCC	TTC=F TCC=S GTC=V GCC=A	4	4	768	256
A330	TKB	BKT (C/G/T)(G/T)T	CGT CTT GGT GTT TGT TTT	GCA GAA CCA CAA ACA AAA	GCA=A GAA=E CCA=P CAA=Q ACA=T AAA=K	6	6	4 608	1 536
T438	DHS	DHS (A/G/T)(A/T/C)(C/G)	AAC AAG ATC ATG ACC ACG GAC GAG GTC GTG GCC GCG TAC TAG TTC TTG TCC TCG	AAC AAG ATC ATG ACC ACG GAC GAG GTC GTG GCC GCG TAC TAG TTC TTG TCC TCG	AAC=N AAG=K ATC=I ATG=M ACC=T ACG=T GAC=D GAG=E GTC=V GTG=V GCC=A GCG=A TAC=Y TAG=* TTC=F TTG=L TCC=S TCG=S	18	13	82 944	19 968

ANEXO 2. Simulación de los ensayos de actividad a las diferentes condiciones

Soluciones stock:

- Ácido *p*-cumárico 40 mM
- Acido cafeico 40 mM
- NADPH 7 mM
- Buffer KPi (100mM, pH 8)

Reacciones ensayadas

- Condición 1, en ausencia de lisado celular y de NADPH

Serie A		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Buffer (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	200
	H₂O (μL)	100	98	96	94	92	90	88	86	84	82	80	0
	Ac. <i>p</i>-cumárico 4mM (μL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	0

Serie B		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Buffer (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	200
	H₂O (μL)	100	98	96	94	92	90	88	86	84	82	80	0
	Ac. Cafeico 4mM (μL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	0

Serie C		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Buffer (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	H₂O (μL)	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	100
	Ac. cafeico 4mM (μL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	0
	Ac. <i>p</i>-cumárico 4mM (μL)	20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	0	0

- Condición 2, en presencia de lisado celular

Serie A		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Extracto proteico	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	Buffer (μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	H₂O (μL)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	Ac. <i>p</i>-cumárico 4mM (μL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	0

Serie B		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Extracto proteico	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	Buffer (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	H₂O (µL)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	Ac. Cafeico 4mM (µL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	0

Serie C		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Extracto proteico	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	Buffer (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	H₂O (µL)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	Ac. Cafeico 4mM (µL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	0
	Ac. p-cumárico 4mM (µL)	20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	0	0

Condición 3, en presencia de lisado celular y NADPH

Serie A		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	NADPH 7 mM (µL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Extracto proteico	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	Buffer (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	H₂O (µL)	40	38	36	34	32	30	28	26	24	22	20	40
	Ac. p-cumárico 4mM (µL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	0

Serie B		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	NADPH 7 mM (µL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Extracto proteico	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	Buffer (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	H₂O (µL)	40	38	36	34	32	30	28	26	24	22	20	40
	Ac. Cafeico 4mM (µL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	0

Serie C		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	NADPH 7 mM (µL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Extracto proteico	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	Buffer (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	H₂O (µL)	40	38	36	34	32	30	28	26	24	22	20	40
	Ac. Cafeico 4mM (µL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	0
	Ac. p-cumárico 4mM (µL)	20	18	16	14	12	10	8	6	4	2	0	0

ANEXO 3. Obtención de productos de PCR para la construcción de la biblioteca acotada

➤ Obtención de fragmento NcoI/R47S/Y51W

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN templado (100 ng/uL)	4
Oligo Forward (NcoI) 10 pmol	5
Oligo Reverse (R47Y51W) 10 pmol	5
ddH ₂ O	61

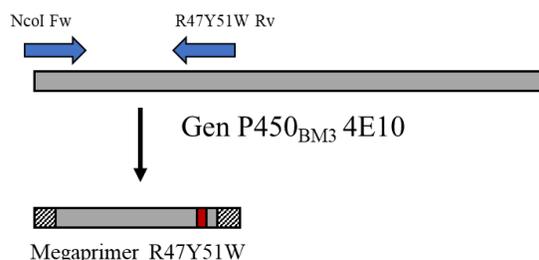


Figura 57. Obtención de megaprimero NcoI/R47S/Y51W.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 25 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 68°C por 30s; seguidos de un ciclo de extensión final de 68°C de 3 min.

➤ Obtención de fragmento NcoI/R47S/A328/330PFW

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN templado (100 ng/uL)	4
Megaprimero R47/Y51 (10 ng/μL)	4
Oligo Rv (A330PFW) equimolar a megaprimero	1
ddH ₂ O	66

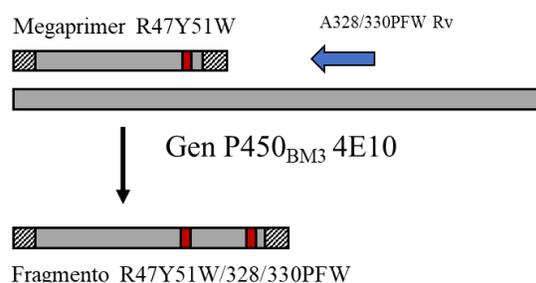


Figura 58. Obtención de fragmento R47/Y51/A328/330.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 27 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 30s, 54°C por 30s, 68°C por 1 min; seguidos de un ciclo de extensión final de 68°C de 5 min.

➤ Extensión de NcoI/R47/Y51W/A328/330 posterior a SacI

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN templado (100 ng/μL)	4
Megaprimer 47/51/328/330 (23ng/μL)	10
Oligo Reverse (S566Rv) (equimolar a megaprimer)	1
ddH ₂ O	60

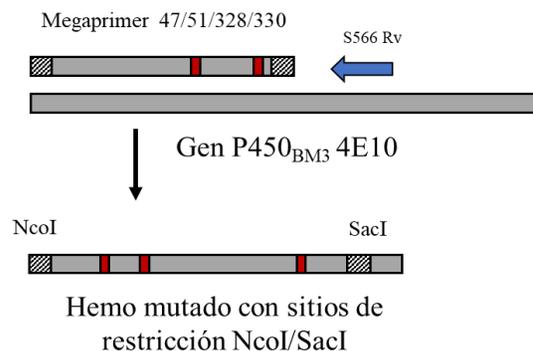


Figura 59. Extensión de megaprimer posterior a SacI.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 32 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 30s, 60°C por 45s, 68°C por 1 min 45s; seguidos de un ciclo de extensión final de 68°C de 8 min.

ANEXO 3.1 Obtención de productos de PCR para la generación de la tercera biblioteca de variantes.

➤ Obtención de fragmento NcoI/47/51/82/87

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN templado (100 ng/μL)	4
Oligo Fw NcoI 10 pmol	5
Oligo Reverse (F82/87)	5
ddH ₂ O	61

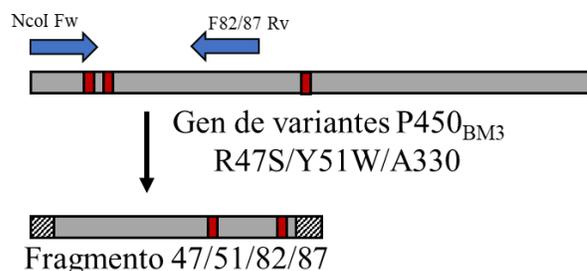


Figura 60. Obtención de fragmento NcoI/47/51/82/87.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 27 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 30s, 57°C por 45s, 68°C por 30s; seguidos de un ciclo de extensión final de 68°C de 5 min.

➤ Extensión de megaprimer NcoI/47/51/82/ posterior a SacI

Mezcla de reacción	μL
Buffer PFU	10
dNTPs	10
PFU polimerasa	5
ADN plasmídico con mutaciones en 47/51/328/330 (100 ng/μL)	5
Megaprimer 47/51/82/87 (50ng/μL)	25
Oligo S566Rv (equimolar a megaprimer)	1
ddH ₂ O	60

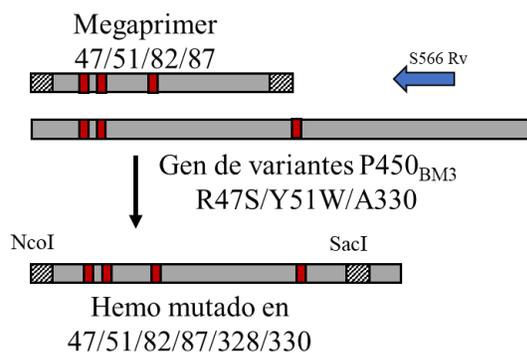
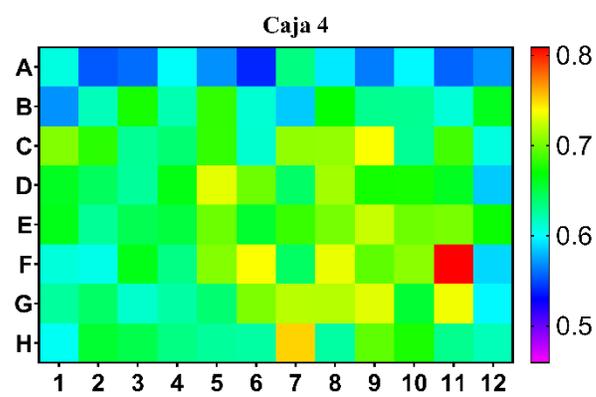
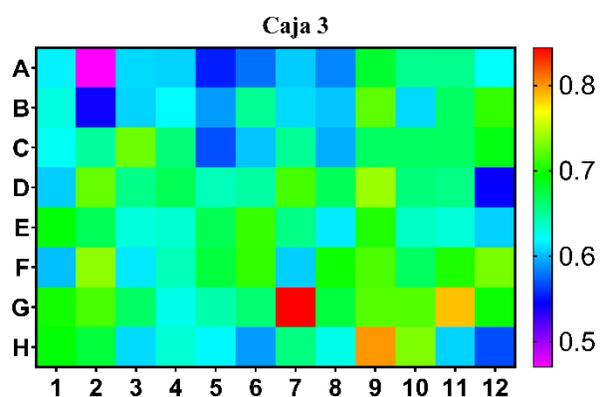
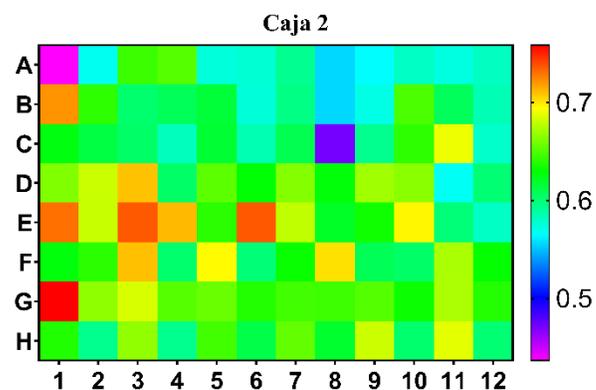
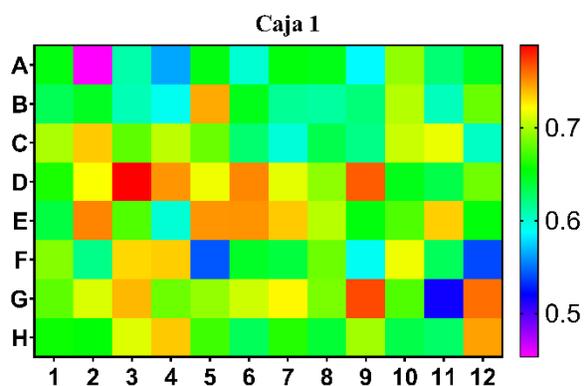


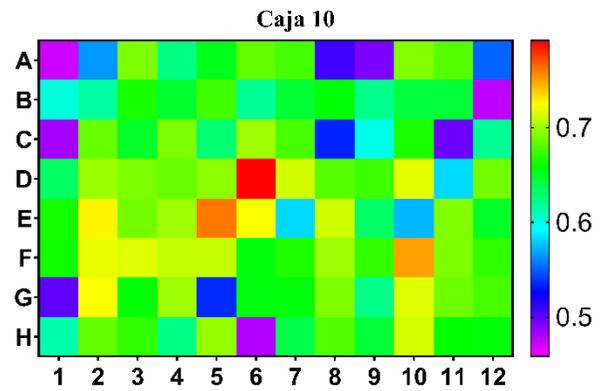
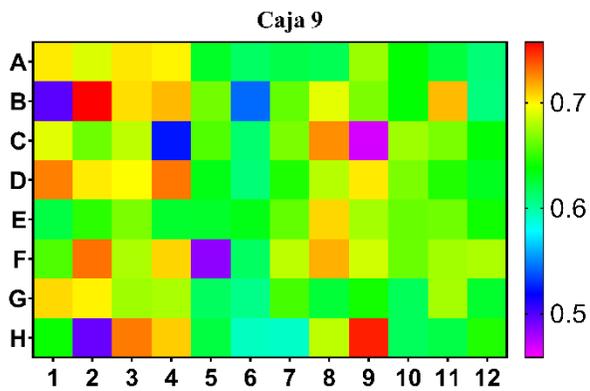
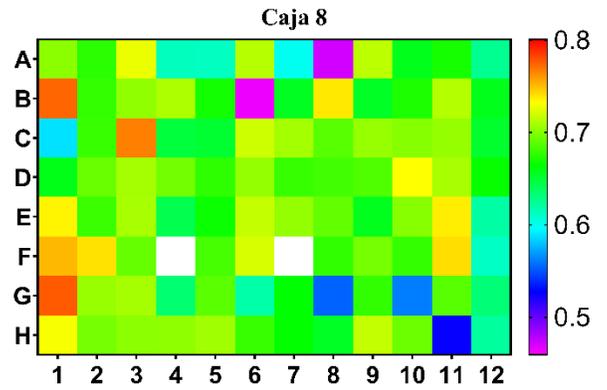
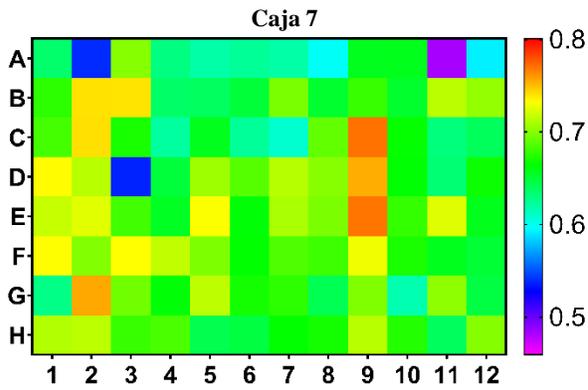
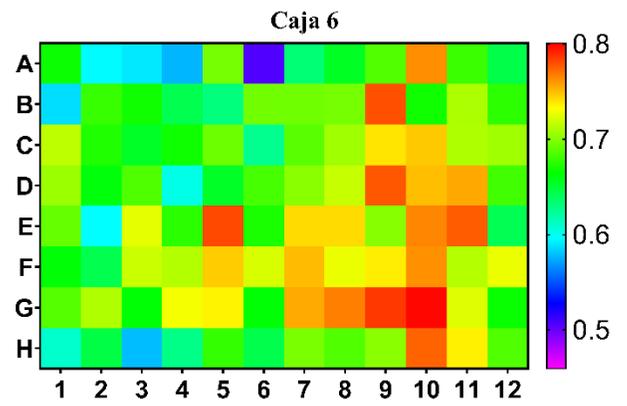
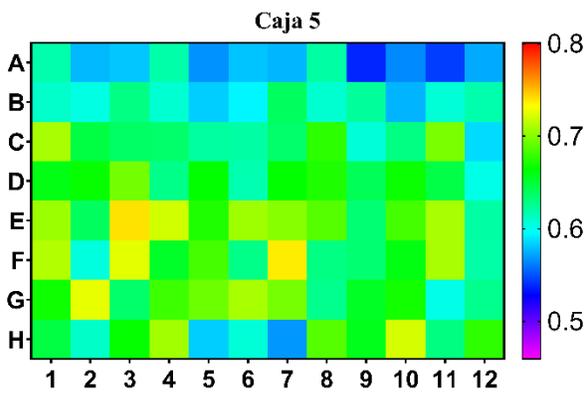
Figura 61. Extensión de megaprimer posterior a SacI.

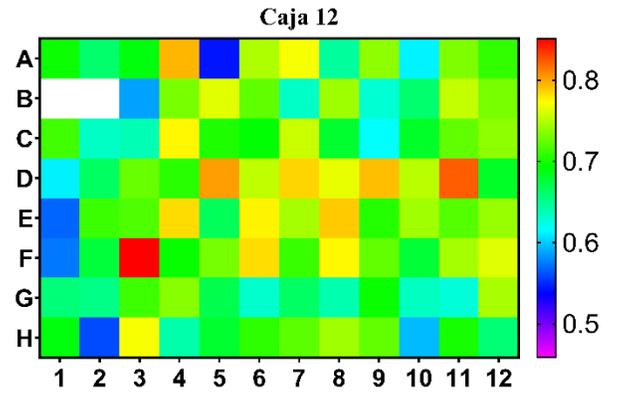
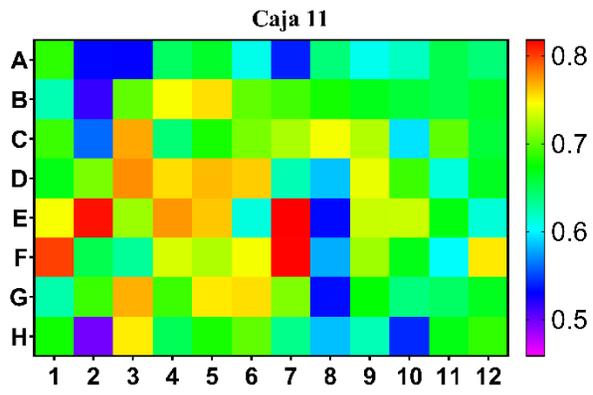
Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 30s, 58°C por 45s, 68°C por 1 min 45s; seguidos de un ciclo de extensión final de 68°C de 8 min.

ANEXO 4. Tamizaje de la biblioteca R47/Y51/A82/F87/A328/A330/T438

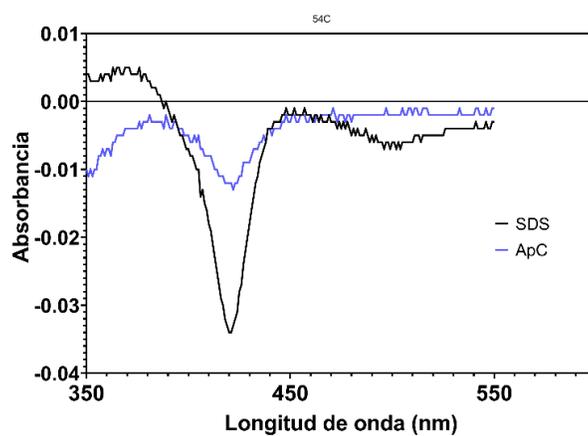
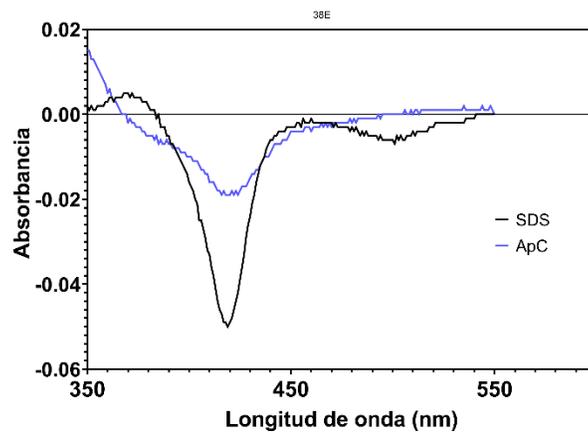
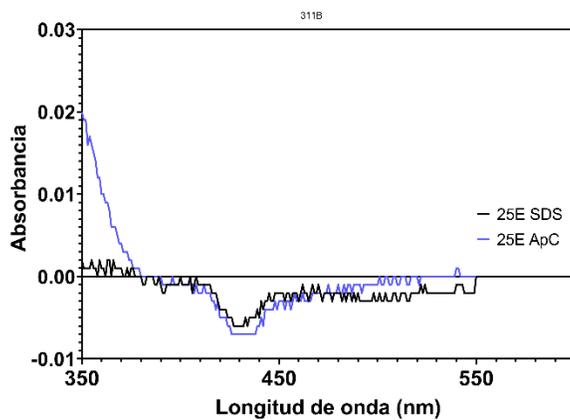
Se muestran los mapas de calor que representan los valores de absorbancia obtenidos mediante el ensayo de Fe(III)-FZ en una escala que varía de 0.45-0.5 a 0.7-0.8.







ANEXO 5. Espectros diferenciales de unión a sustratos de las variantes purificadas



10. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Rocha, C. G., Gamble, C. G., Lonsdale, R., Li, A., Nett, N., Hoebenreich, S. y Reetz, M. T. (2018). P450-catalyzed regio-and diastereoselective steroid hydroxylation: efficient directed evolution enabled by mutability landscaping. *ACS Catalysis*, 8(4), 3395-3410.
- Ainsworth, E. A. y Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.
- Alcalde, M., Farinas, E. T. y Arnold, F. H. (2004). Colorimetric high-throughput assay for alkene epoxidation catalyzed by cytochrome P450 BM-3 variant 139-3. *SLAS Discovery*, 9(2), 141-146.
- Arnold, F. H., Wintrode, P. L., Miyazaki, K. y Gershenson, A. (2001). How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends in biochemical sciences*, 26(2), 100-106.
- Arnold, F. H. y Georgiou, G. (Eds.). (2008). *Directed enzyme evolution: screening and selection methods* (Vol. 230). Springer Science & Business Media.
- Bähr, S., Brinkmann-Chen, S., Garcia-Borràs, M., Roberts, J. M., Katsoulis, D. E., Houk, K. N. y Arnold, F. H. (2020). Selective enzymatic oxidation of silanes to silanols. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(36), 15507-15511.
- Barnes, H. J. (1996). Maximizing expression of eukaryotic cytochrome P450s in *Escherichia coli*. *Methods in enzymology*, 272, 3-14.
- Branco, R. J., Seifert, A., Budde, M., Urlacher, V. B., Ramos, M. J. y Pleiss, J. (2008). Anchoring effects in a wide binding pocket: The molecular basis of regioselectivity in engineered cytochrome P450 monooxygenase from *B. megaterium*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 73(3), 597-607.
- Brandenberg, O. F., Miller, D. C., Markel, U., Ouald Chaib, A. y Arnold, F. H. (2019). Engineering chemoselectivity in hemoprotein-catalyzed indole amidation. *ACS catalysis*, 9(9), 8271-8275.
- Brannigan, J. A. y Wilkinson, A. J. (2002). Protein engineering 20 years on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(12), 964-970.
- Berker, K. I., Güçlü, K., Demirata, B. y Apak, R. (2010). A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*, 2(11), 1770-1778.
- Cheetham, P. S. y Banister, N. E. (2000). *U.S. Patent No. 6,066,311*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Chen, M. M., Snow, C. D., Vizcarra, C. L., Mayo, S. L. y Arnold, F. H. (2012). Comparison of random mutagenesis and semi-rational designed libraries for improved cytochrome

- P450 BM3-catalyzed hydroxylation of small alkanes. *Protein Engineering, Design y Selection*, 25(4), 171-178.
- Chica, R. A., Doucet, N. y Pelletier, J. N. (2005). Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Current opinion in biotechnology*, 16(4), 378-384.
- Coelho, P. S., Brustad, E. M., Kannan, A. y Arnold, F. H. (2013). Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes. *Science*, 339(6117), 307-310.
- Coelho, P. S., Wang, Z. J., Ener, M. E., Baril, S. A., Kannan, A., Arnold, F. H. y Brustad, E. M. (2013). A serine-substituted P450 catalyzes highly efficient carbene transfer to olefins in vivo. *Nature chemical biology*, 9(8), 485-487.
- Cong, Z., Shoji, O., Kasai, C., Kawakami, N., Sugimoto, H., Shiro, Y. y Watanabe, Y. (2015). Activation of wild-type cytochrome P450BM3 by the next generation of decoy molecules: enhanced hydroxylation of gaseous alkanes and crystallographic evidence. *Acs Catalysis*, 5(1), 150-156.
- Devery, J. J. y Stephenson, C. R. (2015). Dual catalysis at the flick of a switch. *Nature*, 519(7541), 42-43.
- Dennig, A., Weingartner, A. M., Kardashliev, T., Müller, C. A., Tassano, E., Schürmann, M. y Schwaneberg, U. (2017). An Enzymatic Route to α -Tocopherol Synthons: Aromatic Hydroxylation of Pseudocumene and Mesitylene with P450 BM3. *Chemistry—A European Journal*, 23(71), 17981-17991.
- Dennig, A., Marienhagen, J., Ruff, A. J., Guddat, L. y Schwaneberg, U. (2012). Directed Evolution of P 450 BM 3 into ap-Xylene Hydroxylase. *ChemCatChem*, 4(6), 771-773.
- Desai, A. (2011). Sitagliptin manufacture: a compelling tale of green chemistry, process intensification, and industrial asymmetric catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(9), 1974-1976.
- Fasan, R., Meharena, Y. T., Snow, C. D., Poulos, T. L. y Arnold, F. H. (2008). Evolutionary history of a specialized p450 propane monooxygenase. *Journal of molecular biology*, 383(5), 1069-1080.
- Forloni, M., Liu, A. Y. y Wajapeyee, N. (2019). Megaprimer Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Mutagenesis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6).
- Furuya, T., Arai, Y. y Kino, K. (2012). Biotechnological production of caffeic acid by bacterial cytochrome P450 CYP199A2. *Applied and environmental microbiology*, 78(17), 6087-6094.
- Galanie, S., Entwistle, D. y Lalonde, J. (2020). Engineering biosynthetic enzymes for industrial natural product synthesis. *Natural product reports*, 37(8), 1122-1143.
- Glieder, A. y Meinhold, P. (2003). High-throughput screens based on NAD (P) H depletion. *Directed enzyme evolution: screening and selection methods*, 157-170.

- Gomes, C. A., Girão da Cruz, T., Andrade, J. L., Milhazes, N., Borges, F. y Marques, M. P. M. (2003). Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure–activity study. *Journal of medicinal chemistry*, 46(25), 5395-5401.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M. y Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(3), 330-344.
- Haseltine, E. L. y Arnold, F. H. (2007). Synthetic gene circuits: design with directed evolution. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36, 1-19.
- Isin, E. M. y Guengerich, F. P. (2006). Kinetics and thermodynamics of ligand binding by cytochrome P450 3A4. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9127-9136.
- Isin, E. M. y Guengerich, F. P. (2008). Substrate binding to cytochromes P450. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392, 1019-1030.
- Jiménez, J. (2019). Síntesis de ácido cafeico usando variantes del citocromo bm3. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio institucional de la UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2019/diciembre/0798977/Index.html>
- Korendovych, I. V. (2018). Rational and semirational protein design. *Protein Engineering*, 15-23.
- Li, Q.S., Schwaneberg, U., Fischer, P. y Schmid, R. D. (2000). Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chemistry—A European Journal*, 6(9), 1531-1536.
- Lin, Y. y Yan, Y. (2012). Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microbial cell factories*, 11, 1-9.
- Meinhold, P., Peters, M. W., Hartwick, A., Hernandez, A. R. y Arnold, F. H. (2006). Engineering cytochrome P450 BM3 for terminal alkane hydroxylation. *Advanced Synthesis y Catalysis*, 348(6), 763-772.
- Morlock LK, Böttcher D y Bornscheuer UT. (2018). Simultaneous detection of NADPH consumption and H₂O₂ production using the Ampliflu™ ed assay for screening of P450 activities and uncoupling. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 985-994.
- Narhi, L. O. y Fulco, A. J. (1986). Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry*, 261(16), 7160-7169.
- Nelson, D. R. (2018). Cytochrome P450 diversity in the tree of life. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1866(1), 141-154.
- Neylon, C. (2004). Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic acids research*, 32(4), 1448-1459.

- Noble, M. A., Miles, C. S., Chapman, S. K., Lysek, D. A., MacKay, A. C., Reid, G. A. y Munro, A. W. (1999). Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *Biochemical Journal*, 339(2), 371-379.
- Omura, T. y Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 239(7), 2370-2378.
- Peters, M. W., Meinhold, P., Glieder, A. y Arnold, F. H. (2003). Regio- and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450 BM-3. *Journal of the American Chemical Society*, 125(44), 13442-13450.
- Porter, J. L., Rusli, R. A. y Ollis, D. L. (2016). Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis. *ChemBioChem*, 17(3), 197-203.
- Reetz, M. T., Carballeira, J. D., Peyralans, J., Höbenreich, H., Maichele, A. y Vogel, A. (2006). Expanding the substrate scope of enzymes: combining mutations obtained by CASTing. *Chemistry—A European Journal*, 12(23), 6031-6038.
- Reikofski, J. y Tao, B. Y. (1992). Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnology advances*, 10(4), 535-547.
- Saab-Rincón, G., Alwaseem, H., Guzmán-Luna, V., Olvera, L. y Fasan, R. (2018). Stabilization of the Reductase Domain in the Catalytically Self-Sufficient Cytochrome P450BM3 by Consensus-Guided Mutagenesis. *ChemBioChem*, 19(6), 622-632.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T. y Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International journal of pharmaceutics*, 403(1-2), 136-138.
- Schenkman, J. B. y Jansson, I. (2006). Spectral analyses of cytochromes P450. *Cytochrome P450 protocols*, 11-18.
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P. y Werck-Reichhart, D. (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36566-36574.
- Sheldon, R. A. y Woodley, J. M. (2018). Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chemical reviews*, 118(2), 801-838.
- Sheldon, R. A. y Brady, D. (2018). The limits to biocatalysis: pushing the envelope. *Chemical Communications*, 54(48), 6088-6104.
- Shoji, O., Kunimatsu, T., Kawakami, N. y Watanabe, Y. (2013). Highly Selective Hydroxylation of Benzene to Phenol by Wild-type Cytochrome P450BM3 Assisted by Decoy Molecules. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(26), 6606-6610.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventó's, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.

- Tsotsou, G. E., Cass, A. E. G. y Gilardi, G. (2002). High throughput assay for cytochrome P450 BM3 for screening libraries of substrates and combinatorial mutants. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(1-2), 119-131.
- Walsh, C. (2001). Enabling the chemistry of life. *Nature*, 409(6817), 226-231.
- Wang, G. F., Shi, L. P., Ren, Y. D., Liu, Q. F., Liu, H. F., Zhang, R. J. y Zuo, J. P. (2009). Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antiviral research*, 83(2), 186-190.
- Wang, Z. J., Renata, H., Peck, N. E., Farwell, C. C., Coelho, P. S. y Arnold, F. H. (2014). Improved cyclopropanation activity of histidine-ligated cytochrome P450 enables the enantioselective formal synthesis of levomilnacipran. *Angewandte Chemie*, 126(26), 6928-6931.
- Whitehouse, C. J., Rees, N. H., Bell, S. G. y Wong, L. L. (2011). Dearomatisation of o-Xylene by P450BM3 (CYP102A1). *Chemistry–A European Journal*, 17(24), 6862-6868.
- Whitehouse, C. J., Bell, S. G. y Wong, L. L. (2012). P450 BM3 (CYP102A1): connecting the dots. *Chemical Society Reviews*, 41(3), 1218-1260.
- Wong, T. S., Wu, N., Roccatano, D., Zacharias, M. y Schwaneberg, U. (2005). Sensitive assay for laboratory evolution of hydroxylases toward aromatic and heterocyclic compounds. *SLAS Discovery*, 10(3), 246-252.
- Zhang, X., & Li, S. (2017). Expansion of chemical space for natural products by uncommon P450 reactions. *Natural product reports*, 34(9), 1061-1089.
- Zeng, W., Guo, L., Xu, S., Chen, J. y Zhou, J. (2020). High-throughput screening technology in industrial biotechnology. *Trends in biotechnology*, 38(8), 888-906.
- Zilly, F. E., Acevedo, J. P., Augustyniak, W., Deege, A., Häusig, U. W. y Reetz, M. T. (2011). Tuning a P450 enzyme for methane oxidation. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(12), 2720-2724.