



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

CLONACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
CINÉTICA DE LA tRNASA Z DE *E. coli*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
JOSÉ EDUARDO OLEA HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2013



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:

PRESIDENTE: Profesora Luz del Carmen Castellanos Román

VOCAL: Profesor Luis Fernando Olguín Contreras

SECRETARIO: Profesor Euclides Avila Chávez

1er. SUPLENTE: Profesora Emma González Chimeo

2do. SUPLENTE: Profesor Gerardo Omar Hernández Segura

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Biofísicoquímica, Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras _____

SUSTENTANTE:

José Eduardo Olea Hernández _____

Durante la realización del presente proyecto de tesis se contó con financiamiento para equipos y reactivos por parte del Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado PAIP 3290-14 y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT-DGAPA IN104210-3; así como de una beca por parte del Programa 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química correspondiente al periodo 2011-2012.

Índice general

1. Introducción	1
1.1 tRNasa Z.....	1
1.1.1 tRNA	1
1.1.2 Maduración del tRNA.....	3
1.1.3 tRNasa Z.....	4
1.1.4 Estructura de la tRNasa Z ^s	5
1.1.5 Función biológica	8
1.1.6 Sustratos y mecanismo de reacción enzimática	9
1.2 Promiscuidad catalítica	11
1.2.1 Conceptos.....	11
1.2.2 Actividad catalítica y mecanismos enzimáticos	12
1.2.3 Promiscuidad catalítica y evolución enzimática	13
2. Justificación	17
3. Objetivos.....	19
4. Hipótesis.....	20
5. Material y métodos.....	21
5.1 Clonación	21
5.1.1 PCR	21
5.1.2 Producción del plásmido pET-28c/ATPasa.....	23
5.1.3 Digestión.....	24
5.1.4 Ligación y Transformación.....	25
5.2 Purificación.....	27

5.2.1 Estudios de inducción	27
5.2.2 Cromatografía de afinidad	29
5.2.3 Digestión con proteasa TEV	29
5.2.4 Cromatografía de intercambio iónico	30
5.3 Caracterización cinética	31
5.3.1 Actividad nativa.....	31
5.3.2 Actividad promiscua.....	34
6. Resultados y discusión	36
6.1 Clonación	36
6.1.1 PCR	36
6.1.2 Producción del plásmido pET-28c/ATPasa.....	38
6.1.3 Digestión.....	39
6.1.4 Ligación y Transformación.....	40
5.2 Purificación.....	42
5.2.1 Estudios de inducción	42
5.2.2 Cromatografía de afinidad	43
5.2.3 Digestión con proteasa TEV	43
5.2.4 Cromatografía de intercambio iónico.	45
6.3 Caracterización cinética	47
6.3.1 Actividad nativa.....	47
6.3.2 Actividad promiscua.....	55
7. Conclusiones	64
8. Bibliografía.....	65
9. Anexos.....	68

Índice de figuras

Figura 1.1 Estructura del tRNA.....	2
Figura 1.2 Vías de maduración del tRNA.	4
Figura 1.3 Estructura de la tRNasa Z de <i>E. coli</i> (PDBID: 2CBN).....	6
Figura 1.4 tRNasa Z de <i>B. subtilis</i> unida a tRNA ^{Thr} (PDB ID: 2FK6)	7
Figura 1.5 Sustratos alternativos de la tRNasa Z.	9
Figura 1.6 Mecanismo de reacción de la tRNasa Z sobre el pre-tRNA.	10
Figura 1.7 Hipótesis de Jensen sobre la divergencia de nuevos miembros en una familia enzimática.	14
Figura 1.8 Evolución dirigida de nuevas funciones enzimáticas.....	15
Figura 2.1 Enlaces fosfodiéster susceptibles de hidrólisis mediante la tRNasa Z en las moléculas de bpNPP (izquierda) y RNA (derecha).	17
Figura 2.2 Reacción para el estudio de la actividad nativa.....	18
Figura 2.3 Sustratos promiscuos propuestos.	18
Figura 6.1 Esquema de las reacciones de PCR.....	37
Figura 6.2 Reacciones de PCR efectuadas.....	38
Figura 6.3 Purificación del plásmido pET-28c/ATPasa.	38
Figura 6.4 Digestión del plásmido pET-28c/ATPasay el inserto con las enzimas <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	39
Figura 6.5 Análisis de restricción de las muestras de plásmido recombinante con las enzimas <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	40
Figura 6.6 Análisis de restricción de las muestras de plásmido recombinante con la enzima <i>BglI</i>	41
Figura 6.7 Análisis de restricción de las muestras de plásmido recombinante con la enzima <i>NcoI</i>	41
Figura 6.8 Comparación de condiciones de inducción.	42
Figura 6.9 Cromatografía de afinidad.....	43
Figura 6.10 Digestión de tRNasa con proteasa TEV.	44
Figura 6.11 Cromatografía de intercambio iónico.....	45
Figura 6.12 Análisis de fracciones de la cromatografía de intercambio iónico	46

Figura 6.13 Panorama general de la purificación de la tRNasa Z de <i>E. coli</i>	47
Figura 6.14 Espectro del sustrato (bis- ρ -nitrofenilfosfato) y producto (ρ -nitrofenol) para el estudio de la actividad nativa en Buffer de Ensayo.	48
Figura 6.15 Espectros de ρ -nitrofenol a diferentes concentraciones.....	48
Figura 6.16 Curva patrón de ρ -nitrofenol a 400 nm.....	49
Figura 6.17 Velocidad inicial en función de la concentración de enzima.....	50
Figura 6.18 Punto isobéptico para la actividad nativa.....	51
Figura 6.19 Curso de reacción para la actividad nativa.....	51
Figura 6.20 Cursos de reacción para la actividad nativa a diferentes concentraciones de sustrato.....	52
Figura 6.21 Ajuste de la cinética de la actividad nativa mediante la ecuación de Michaelis-Menten.	54
Figura 6.22 Ajuste de la cinética de la actividad nativa mediante la ecuación de Hill	54
Figura 6.23 Espectro del sustrato (ρ -nitrofenilfosfato) y producto (ρ -nitrofenol) para el estudio de la actividad promiscua monofosfatasa.	55
Figura 6.24 Espectro del sustrato (ρ -nitrofenilsulfato) y producto (ρ -nitrofenol) para el estudio de la actividad promiscua sulfatasa.	56
Figura 6.25 Curva patrón de ρ -nitrofenol a 410 nm.....	56
Figura 6.26 Dependencia de la velocidad inicial respecto a la concentración de enzima (actividad promiscua monofosfatasa).	58
Figura 6.27 Dependencia de la velocidad inicial respecto a la concentración de enzima (actividad promiscua sulfatasa).....	58
Figura 6.28 Cursos de reacción para la actividad promiscua (monofosfatasa) a diferentes concentraciones de sustrato.....	59
Figura 6.29 Ajuste de la cinética de la actividad promiscua monofosfatasa mediante la ecuación de Michaelis-Menten.....	61
Figura 6.30 Ajuste de la cinética de la actividad promiscua monofosfatasa mediante la ecuación de Hill.....	61
Figura 9.1 Secuencia del plásmido recombinante a partir delPromotor T7.	69

Figura 9.2 Secuencia del plásmido recombinante a partir del Terminador T7.....	70
Figura 9.3 Mapa del plásmido pET-28c.....	71

Índice de tablas

Tabla 5.1 Mezcla de reacción para PCR 1	22
Tabla 5.2 Mezcla de reacción para PCR2	23
Tabla 5.3 Mezclas de reacción para doble digestión.....	24
Tabla 5.4 Mezcla de reacción para desfosforilación.....	25
Tabla 5.5 Mezcla de reacción para ligación	25
Tabla 5.6 Mezclas de reacción para patrones de digestión.....	26
Tabla 5.7 Condiciones de inducción.....	28
Tabla 5.8 Programa para cromatografía de intercambio iónico	31
Tabla 5.9 Estudio de la velocidad inicial y estabilidad enzimática para actividad nativa.....	32
Tabla 5.10 Ensayos cinéticos para actividad nativa	33
Tabla 5.11 Estudio de la velocidad inicial y estabilidad enzimática para actividades promiscuas	34
Tabla 5.12 Ensayos cinéticos para actividad promiscua	35
Tabla 6.1 Secuencia del gen de la tRNasa Z de <i>E.coli</i> /BL21 (GeneID: 946760)....	36
Tabla 6.2 Parámetros de ajuste para la actividad nativa.	53
Tabla 6.3 Evaluación de ajustes para la actividad nativa.	53
Tabla 6.4 Parámetros de ajuste para la actividad promiscua (monofosfatasa).	60
Tabla 6.5 Evaluación de ajustes para la actividad promiscua (monofosfatasa). ...	60
Tabla 6.6 Aumento de la velocidad en la reacción nativa y promiscua	62

Resumen

La tRNasa Z es una fosfodiesterasa que pertenece a la familia de las metalo- β -lactamasas y es la enzima responsable de la maduración del extremo 3' de los pre-tRNAs por medio de la remoción de la secuencia presente inmediatamente después del nucleótido discriminador. Diversos estudios sugieren que posee funciones adicionales relacionadas con el metabolismo del mRNA o rRNA, además, ciertas mutaciones en el gen humano de la tRNasa Z se han relacionado con el cáncer de próstata.

En el presente trabajo se estudió la tRNasa Z de *E. coli* con el fin de determinar la presencia de actividades promiscuas que pudieran brindar información sobre su mecanismo enzimático y sus posibles funciones adicionales. El gen de dicha enzima se aisló a partir del DNA genómico de *E. coli* BL21 y se clonó en el plásmido pET-28c. La tRNasa Z se expresó en células de *E. coli* C41 (DE3), se purificó mediante cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico. Finalmente se realizó la caracterización cinética, mediante espectrofotometría UV-Visible, de su actividad nativa fosfodiesterasa sobre el bis- ρ -nitrofenil fosfato (bpNPP) y de sus posibles actividades promiscuas monofosfatasa sobre el ρ -nitrofenil fosfato (pNPP) y sulfatasa sobre el ρ -nitrofenil sulfato (pNPS), dada la similitud estructural que estos compuestos poseen con su sustrato nativo (pre-tRNA).

La actividad nativa de fosfodiesterasa sobre el bpNPP se ajusta al modelo de cooperatividad (ecuación de Hill) con una $k_{\text{cat}} = 60.13 \text{ s}^{-1}$, $K' = 4.83 \text{ mM}$ y un coeficiente de Hill $h = 1.56$ y logra acelerar su hidrólisis 4.63×10^{12} veces respecto a la reacción sin catalizar. La actividad promiscua de monofosfatasa sobre el pNPP se ajusta al modelo de Michaelis-Menten con una $k_{\text{cat}} = 2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $K_m = 23.11 \text{ mM}$ y logra acelerar su hidrólisis 7.41×10^5 veces respecto a la reacción sin catalizar. Durante los experimentos no fue posible detectar actividad promiscua de sulfatasa. El hecho de que la enzima sea capaz de actuar sobre sustratos modelo diferentes a los fosfodiestéres, confirmaría la alta prevalencia de actividades promiscuas dentro de la familia de las metalo- β -lactamasas, brindando una nueva perspectiva sobre las posibles funciones adicionales de la tRNasa Z.

1. Introducción

1.1 tRNasa Z

1.1.1 tRNA

El RNA de transferencia (tRNA) juega un papel crucial en la síntesis de proteínas al transportar a los aminoácidos al ribosoma y descifrar la información contenida en el RNA mensajero (mRNA) a través del apareamiento de bases entre los anticodones del tRNA y el codón correspondiente en el transcripto de mRNA[22].

Las moléculas de tRNA poseen una estructura primaria que corresponde a su secuencia lineal de ribonucleótidos, una estructura secundaria compuesta por tallos/bucles y una estructura terciaria que corresponde a la forma en que dichos tallos/bucles interactúan entre sí [30].

Los tRNAs maduros adoptan una estructura secundaria característica compuesta por 4-5 regiones principales (Figura 1.1 A) [22, 30]:

- 1) El tallo aceptor, formado por los extremos 3' y 5' de la molécula. Dicha región contiene, después del nucleótido discriminador (el único sin aparear en el tallo) en el extremo 3', a la secuencia CCA que funciona como el sitio de unión para el aminoácido correspondiente a cada tRNA (mediante las 3'-nucleotidiltransferasas).
- 2) El brazo D, recibe su nombre debido a que contiene al nucleósido modificado dihidouridina en el loop de dicho brazo, funciona como sitio de reconocimiento para las 3'-nucleotidiltransferasa.

- 3) El brazo del anticodón, recibe su nombre debido a que contiene la secuencia correspondiente al anticodón en el loop de dicho brazo. El apareamiento del anticodón con el codón correspondiente en el mRNA es un fenómeno indispensable en la síntesis de proteínas.
- 4) El brazo T, recibe su nombre debido a que contiene, invariablemente, a la secuencia de nucleósidos timidina-pseudouridina-citosina, actúa como sitio de reconocimiento del ribosoma.
- 5) El bucle variable (V), es la región comprendida entre el brazo T y el brazo del anticodón. Recibe su nombre debido a que su longitud varía de 3 a 21 nucleótidos, algunos de los loops de mayor longitud pueden formar también brazos mediante apareamiento de bases.

Los tRNAs adoptan también una estructura terciaria común, semejante a una “L invertida” (Figura 1.1 B). Esta conformación maximiza la estabilidad al permitir la interacción entre el brazo D y el brazo del anticodón, la interacción entre el brazo T y el tallo aceptor y, además, maximiza la exposición del anticodón para facilitar su interacción con el codón correspondiente del mRNA [30].

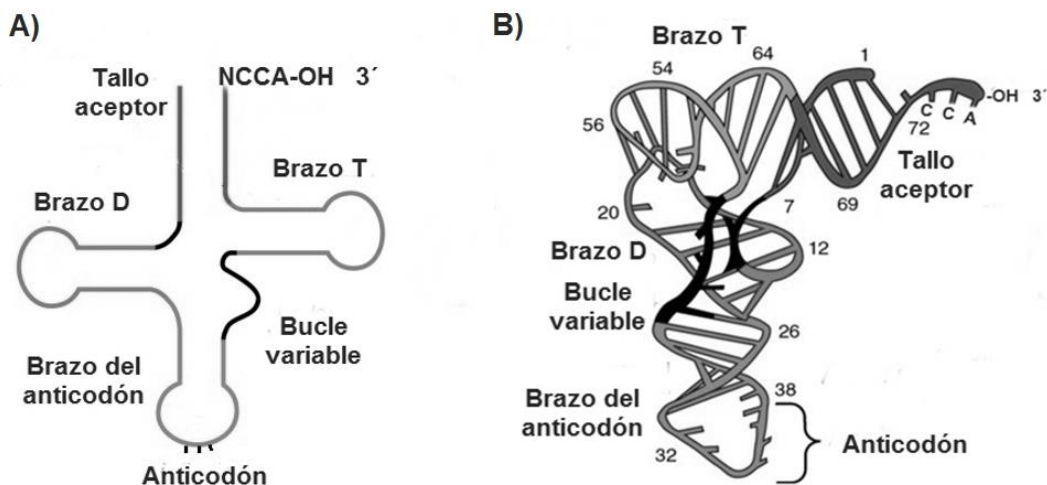


Figura 1.1 Estructura del tRNA.

A) Estructura secundaria de un tRNA mostrando tallos y bucles. B) Estructura tridimensional de un tRNA mostrando tallos y bucles.

Con base en Weaver (2008) [30].

1.1.2 Maduración del tRNA

Todos los tRNAs son sintetizados como precursores y tienen que ser extensivamente procesados para convertirse en moléculas funcionales[30], su maduración involucra diversos pasos que incluyen la remoción de ciertas secuencias de los extremos 5' y 3', el splicing de intrones en eucariontes, la modificación de ciertos nucleótidos y, en ciertos casos, la adición de la secuencia CCA en el extremo 3'[22].

La remoción de la secuencia del extremo 5' es llevada a cabo por la ribonucleoproteína RNasa P, un proceso prácticamente "universal" en los seres vivos. La RNasa P, presente en eucariontes, procariontes y archeas, consiste en una subunidad de RNA que forma un complejo ribonucleoproteico con una proteína en bacterias, normalmente dos en archeas y de nueve a diez en eucariontes. Todas las subunidades de RNA tienen una arquitectura común y comparten ciertos nucleótidos en su núcleo catalítico [10]. La remoción de la secuencia del extremo 3' puede ser un proceso de un solo paso llevado a cabo por una endonucleasa o bien un proceso de dos pasos, que involucra el corte mediante una endonucleasa y la posterior remoción de los nucleótidos remanentes mediante una exonucleasa para generar un extremo 3' maduro. Estas vías se denotan como "endonucleica" y "exonucleica" de acuerdo al tipo de enzima que cataliza el paso final de la maduración [22].

La maduración del extremo 3' de los pre-tRNA a través de la vía exonucleica (Figura 1.2 A) comienza con el corte de la endonucleasa RNasa E, posteriormente la remoción de los nucleótidos remanentes se lleva a cabo mediante un grupo de exonucleasas redundantes, siendo las más importantes la RNasa PH y la RNasa T. Por otro lado, la maduración del extremo 3' de los pre-tRNA a través de la vía endonucleica (Figura 1.2 B) ocurre en un solo paso que involucra el corte de la secuencia mediante la enzima tRNasa Z (también conocida como RNasa Z, 3'-RNasa, ElaC, ZiPD o RNasa BN). La primera evidencia de la maduración del extremo 3' de pre-tRNAs mediante la acción de una sola endonucleasa data de 1979 y fue encontrada en extractos de las vesículas germinales de

anfibios[9]posteriormente ésta se confirmó en levaduras, plantas, mamíferos e insectos [22].

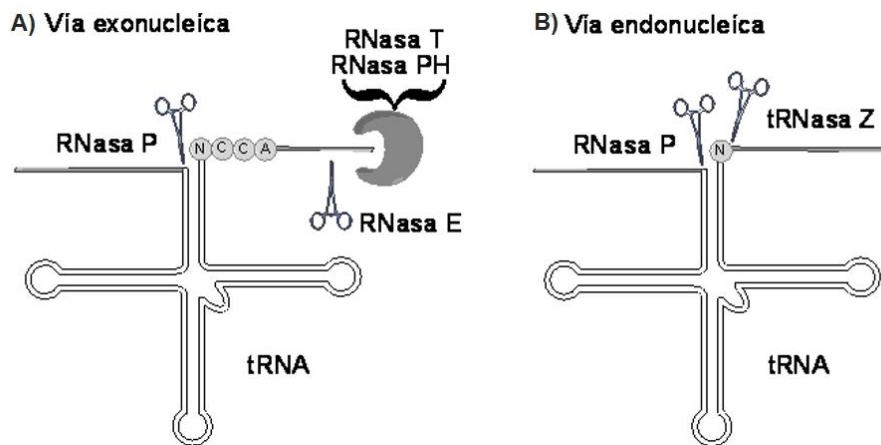


Figura 1.2 Vías de maduración del tRNA.

Se muestran las enzimas involucradas y sus sitios de corte.

1.1.3 tRNasa Z

La tRNasa Z es miembro de la familia de las metalo- β -lactamasas, una familia enzimática que se caracteriza por adoptar una conformación tridimensional común, denominada “sándwich $\alpha\beta/\beta\alpha$ ”, que consiste en un núcleo formado por dos hojas β rodeado por un número variable de hélices α [10]. El nombre de la familia enzimática deriva de las β -lactamasas clase B, las proteínas bacterianas donde la conformación del “sándwich $\alpha\beta/\beta\alpha$ ” fue identificada por primera vez. Las β -lactamasas utilizan iones de zinc para hidrolizar e inactivar antibióticos β -lactámicos, los cuales inhiben el crecimiento bacteriano al interferir en la síntesis de la pared celular. Además de adoptar una conformación similar, las proteínas de la familia de las metalo- β -lactamasas comparten un patrón de histidinas y aspartatos localizados en cinco motivos, I a V. El motivo II, que posee la secuencia consenso HxHxDH (donde x indica cualquier aminoácido), es conocido como el “motivo de histidinas” (Motivo His) y es la secuencia característica de toda la familia de las metalo- β -lactamasas[10]. A través de estudios de cristalografía, se ha determinado que los residuos de los cinco motivos forman un centro catalítico que, generalmente, contiene dos iones metálicos y está localizado entre las dos

hojas β . La amplia especificidad de sustratos de esta familia enzimática puede ser explicada mediante la accesibilidad del sitio activo a un gran número de moléculas. La mayoría de las metalo- β -lactamasas son hidrolasas que utilizan iones de zinc en la catálisis y muchos de los sustratos hidrolizados se caracterizan por la presencia de enlaces éster y al menos una carga. Además de las β -lactamasas clase B, otros miembros de la familia incluyen a la glioxilasa II, alquilsulfatasa y diversas fosfodiesterasas. Ciertos miembros de la familia de las metalo- β -lactamasas, además de la tRNasa Z, se han relacionado con el metabolismo de ácidos nucleicos ya que actúan como nucleasas, por ejemplo: CPSF-73 (hidroliza los precursores de mRNA abajo de la secuencia AAUAA), RC-68/Int11 (participa en la maduración del extremo 3' de precursores de snRNAs), Apolo (lleva a cabo funciones en los telómeros y pueden reparar cruces intercatenarios en el DNA) [10].

En la naturaleza existen dos formas de tRNasa Z: una corta denominada tRNasa Z^S, de entre 280-360 aminoácidos y que se encuentra en eucariontes, procariontes y archeas, y una larga denominada tRNasa Z^L, de aproximadamente el doble de tamaño que la tRNasa Z^S y que ha sido encontrada solo en eucariontes. La tRNasa Z^L aparentemente evolucionó a partir de la tRNasa Z^S a través de duplicación genética. Aunque la fracción C-terminal de la tRNasa Z^L comparte una gran similitud con la secuencia de la tRNasa Z^S, la fracción N-terminal posee una divergencia significativa. El motivo de histidinas presente en la fracción C-terminal está ausente en la fracción N-terminal y el exosito, un motivo estructural característico de la tRNasa Z, está ausente en la fracción C-terminal pero está presente en la fracción N-terminal de la tRNasa Z^L[22].

1.1.4 Estructura de la tRNasa Z^S

La estructura de tres diferentes tRNasa Z^S bacterianas han sido determinadas hasta el momento: *B. subtilis*, *T. maritima* y *E. coli* (Figura 1.3). En los tres casos la enzima es un dímero de dominios de metalo- β -lactamasa, cada monómero contiene un núcleo de dos hojas β de siete hebras opuestas rodeado por

tres hélices alfa en una conformación $\beta\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ [18]. Los monómeros presentan un arreglo frontal que facilita la dimerización a través de puentes de hidrógeno entre las hélices α . Además la tRNasa Z^s posee un elemento estructural denominado exosito o brazo flexible, el cual es único en la familia de las metalo- β -lactamasas y, en consecuencia, un elemento específico de la tRNasa Z (22). El exosito aparece como una especie de brazo flexible que sobresale del cuerpo principal de la proteína y se inserta entre la tercera y la cuarta hebra de una de las hojas β [10]. Participa en la unión y estabilización de las moléculas de pre-tRNA, sin embargo, su ausencia tiene poco efecto en la actividad de la tRNasa Z sobre sustratos pequeños como el bis-p-nitrofenil fosfato (bpNPP) [18].

Aunque las tres estructuras encontradas hasta hoy muestran claramente el motivo metalo- β -lactamasa, también muestran diferencias significativas en sus sitios catalíticos. La subunidad A de la enzima de *B. subtilis* contiene un par de iones de zinc, esenciales para la actividad enzimática, mientras que los residuos del sitio catalítico en la subunidad B se encuentran fuera de posición y son incapaces de coordinar un ión propio. Las subunidades A y B de la enzima de *T. maritima* poseen cada una un átomo de zinc en su sitio activo. Finalmente, la enzima de *E. coli* (Figura 1.3) presenta dos sitios catalíticos funcionales y completamente cargados, ambos con dos iones de zinc (Figura 1.3) [22].

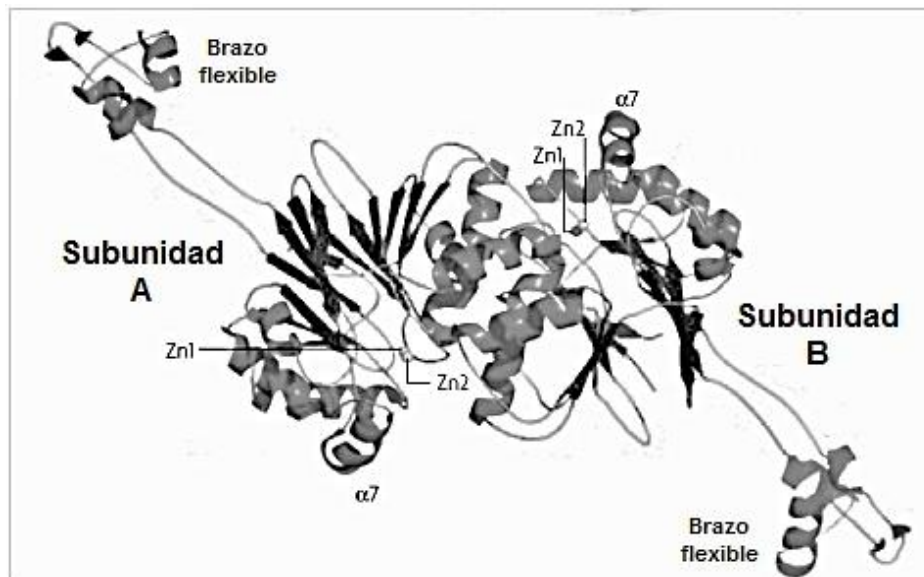


Figura 1.3 Estructura de la tRNasa Z de *E. coli* (PDBID: 2CBN).
Se señalan los elementos estructurales de mayor relevancia.

La estructura de la tRNasa Z de *B. subtilis* unida al tRNA ha sido determinada a una resolución de 2.9 Å (Figura 1.4) mostrando que dos moléculas de tRNA pueden ser acomodadas por un solo dímero. El brazo T y el tallo aceptor del tRNA descansan en la superficie del dímero, sujetas por el brazo flexible de una subunidad y la hélice $\alpha 7$ de la segunda. Esta configuración satisface la observación de que la mayor parte del brazo D y el brazo del anticodón no son necesarios para la hidrólisis *in vitro*. La mayoría del contacto de la tRNasa Z tiene lugar con el esqueleto de fosfodiésteres del tRNA, lo cual es comprensible dada la gran variedad de secuencias de tRNA disponibles que, sin embargo, conservan estructuras terciarias similares. Un canal que tiene la amplitud suficiente para acomodar una cadena simple de RNA emerge del centro catalítico hacia el exterior de la proteína y puede funcionar como la ruta de salida de la secuencia hidrolizada del extremo 3' del pre-tRNA [6].

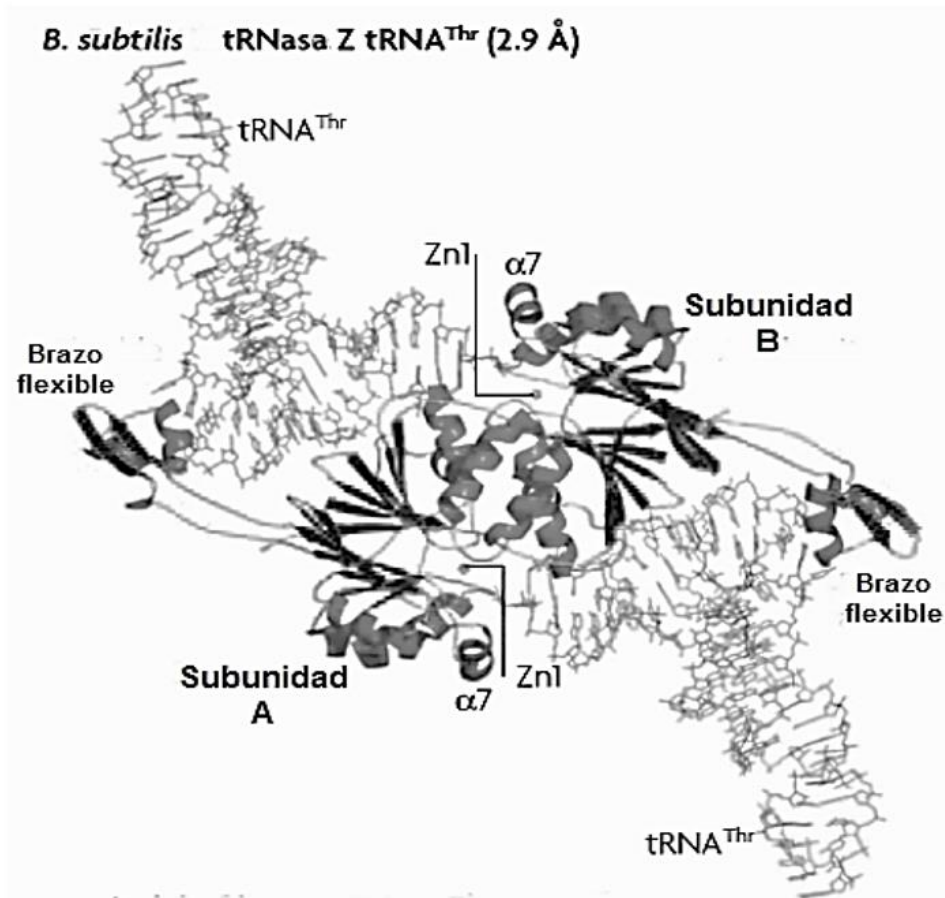


Figura 1.4 tRNasa Z de *B. subtilis* unida a tRNA^{Thr} (PDB ID: 2FK6)
Se muestran las dos moléculas de tRNA que pueden ser procesadas.

1.1.5 Función biológica

La tRNasa Z remueve la secuencia ubicada en el extremo 3' de los pre-tRNAs al realizar un corte inmediatamente después del nucleótido discriminador (el primero sin aparear en el tallo aceptor), dejando un grupo 3'-OH en el tRNA y un grupo 5'-fosfato en el extremo de la secuencia eliminada. De esta manera permite la posterior adición de la secuencia CCA mediante la 3'-nucleotidil transferasa [10]. La secuencia CCA es esencial para que las aminoacil-tRNAsintetasas logren "cargar" a cada tRNA con el aminoácido correspondiente de acuerdo al anticodón que poseen.

A pesar de que el comportamiento de las tRNasas Z de diferentes organismos respecto a la secuencia CCA es muy variado, generalmente actúa como un anti determinante para la actividad de la enzima, lo cual puede impedir un ciclo fútil de corte-adición, sin embargo, algunas enzimas pueden procesar tRNAs con dicha secuencia *in vivo* e *invitro* [29]. Por otro lado, los organismos que no poseen un gen para la tRNasa Z sólo contienen genes de tRNA que poseen la secuencia CCA, sin embargo, algunos organismos que solo contienen genes de tRNA que poseen la secuencia CCA (por ejemplo *E. coli*), también contienen un gen para la tRNasa Z; por lo cual es de gran interés entender la función de dicha enzima en organismos en los que aparentemente es "innecesaria" [8].

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

codifican para tRNAs ha sido asociada con diversos padecimientos como miopatías, encefalopatías, cardiopatías, sordera, etc. [2].

1.1.6 Sustratos y mecanismo de reacción enzimática

Aunque los pre-tRNAs constituyen el sustrato fisiológico de la tRNasa Z, diversos estudios han demostrado que ésta es capaz de hidrolizar otras moléculas, por ejemplo [29]:

A) Micro pre-tRNAs, los cuales consisten en un brazo T, un brazo aceptor y una secuencia en el extremo 3'. Pueden ser procesados por la tRNasa Z^L humana y de algunas levaduras, pero no por la tRNasa Z^S de *E. coli* o *T. marítima* (Figura 1.5 A).

B) EGS-RNA, RNAs híbridos compuestos por una secuencia blanco de RNA y una EGS (secuencia guía externa) que forma un brazo de seis pares de bases. La tRNasa Z es capaz de procesarlos al igual que la RNasa P (Figura 1.5 B).

C) bpNPP/TpNPP, dos sustratos cromogénicos sintéticos. Aunque no se tratan de sustratos fisiológicos, ambos son buenos sustratos modelo para el estudio de la actividad fosfodiesterasa de la tRNasa Z (Figura 1.5 C).

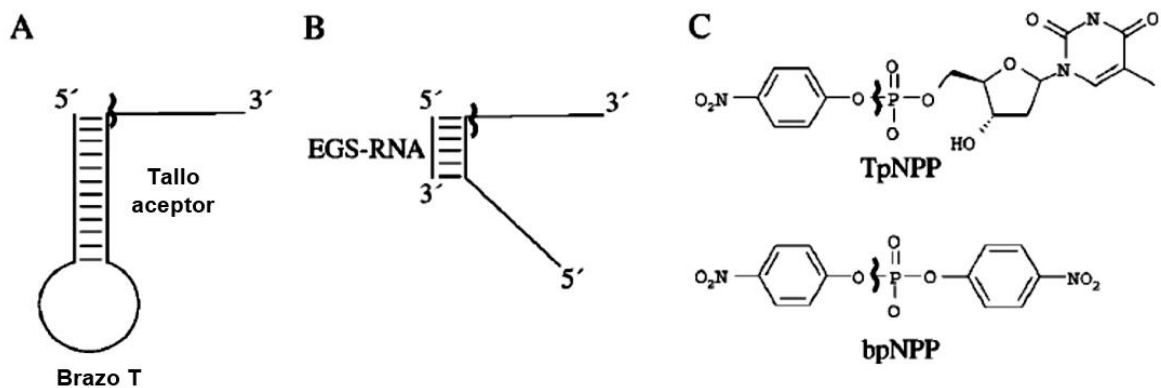


Figura 1.5 Sustratos alternativos de la tRNasa Z.

A) Micro pre-tRNA. B) RNA híbrido C) Sustratos cromogénicos.

Tomado de Vogel *et al* (2005) [29].

Con base en la estructura del sitio catalítico de la subunidad A de la tRNasa Z de *B. subtilis* (Figura 1.6 A) de la Sierra *et al* [6] han propuesto un mecanismo de reacción concertado en el cual el aspartato67 (Asp67) desprotona una molécula de agua (wat147) coordinada por ambos iones de zinc (Zn1 y Zn2), permitiéndole al OH⁻ formado llevar a cabo un ataque nucleofílico sobre el grupo fosfodiéster que se encuentra entre los nucleótidos 73 (nucleótido discriminador) y 74 (nt73 y nt74) de la molécula de pre-tRNA, la cual se encuentra polarizada mediante ambos iones de zinc (Zn1 y Zn2), provocando la ruptura del enlace fosfodiéster. Entonces el oxígeno del extremo 3' del nucleótido discriminador (nt73) es estabilizado mediante el protón de una molécula de agua cercana (wat5), resultando en un tRNA con un grupo 3'-OH. Este mecanismo es plausible para la reacción catalizada por la tRNasa Z de *E. coli*, en base a la similitud estructural del sitio catalítico de dicha enzima, como lo indica la estructura propuesta por Kostelecky *et al* [18] en donde los aminoácidos involucrados en la catálisis son equivalentes (Figura 1.6 B).

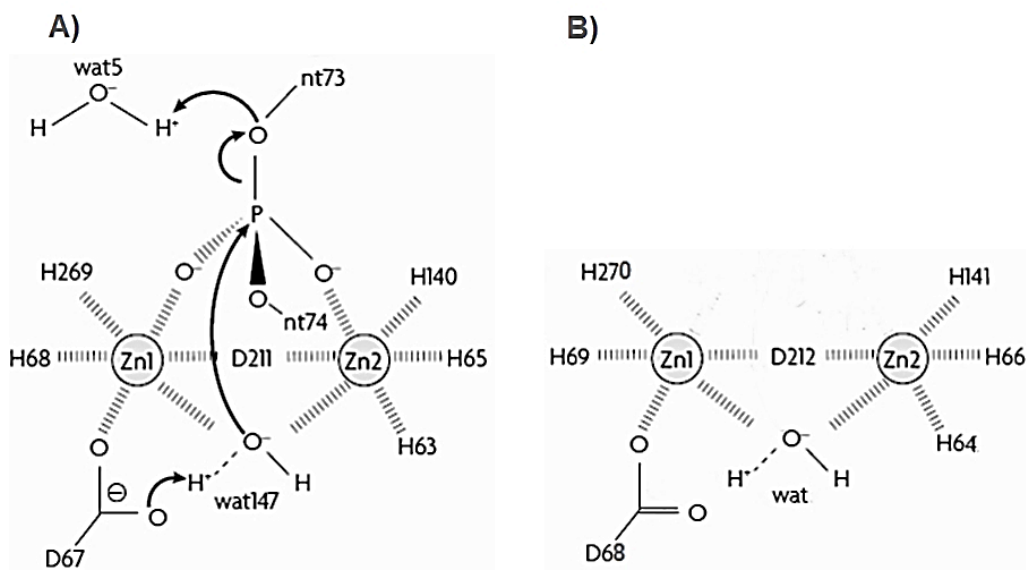


Figura 1.6 Mecanismo de reacción de la tRNasa Z sobre el pre-tRNA.

A) Mecanismo de reacción propuesto para la tRNasa Z de *B. subtilis*. B) Sitio catalítico de la tRNasa Z de *E. coli*. Modificado de Kostelecky *et al* (2006) [18].

En resumen, las aparentes funciones adicionales que desempeña, su pertenencia a una familia que posee un amplio rango de posibles sustratos

(metalo- β -lactamasas) y su relación con padecimientos como el cáncer de próstata convierten a la tRNasa Z en una enzima de gran interés.

1.2 Promiscuidad catalítica

Tradicionalmente las enzimas se han definido como catalizadores extremadamente específicos y eficientes. Sin embargo, desde hace tiempo existen numerosos ejemplos en la literatura que mencionan como muchas enzimas (piruvato descarboxilasa, anhidrasa carbónica, pepsina y quimotripsina, por ejemplo) son capaces de catalizar, generalmente a menor velocidad, otras reacciones diferentes a aquellas para las que están fisiológicamente especializadas o han evolucionado, fenómeno conocido como promiscuidad catalítica. Anteriormente los ejemplos encontrados eran considerados simplemente anecdóticos pues no proveían un panorama general de la prevalencia de dicho fenómeno, sin embargo, hoy en día la promiscuidad catalítica ha recibido considerable atención dada su importancia en diferentes campos del conocimiento. Numerosos artículos han ahondado en los aspectos mecanísticos y evolutivos de dicho fenómeno, así como, en su aplicación práctica en síntesis orgánica, ingeniería de proteínas y otros [17]. Pese a la necesidad de una búsqueda sistemática de las actividades promiscuas de las enzimas, existen diversos argumentos que apuntan a que la promiscuidad catalítica, en diferentes rangos y magnitudes, es un fenómeno ampliamente distribuido que debe ser considerado una regla más que una excepción [15].

1.2.1 Conceptos

La *actividad nativa* es la reacción química sobre un sustrato específico, para la cual una enzima ha evolucionado y que es fisiológicamente relevante para el organismo en el cual reside dicha enzima [16]. Aunque muchas enzimas han

evolucionado para actuar sobre diferentes sustratos, su amplio rango de especificidad es una característica inherente para la que han evolucionado, por lo tanto dichas actividades también deben considerarse como nativas. Algunos ejemplos incluyen a las glutatión s-transferasas, la familia del citocromo P450 y algunas enzimas relacionadas con la síntesis de terpenos [27].

La *promiscuidad catalítica* es la capacidad de una enzima para catalizar una o varias reacciones químicas diferentes a la que corresponde a su actividad nativa, es decir, aquella para la que ha evolucionado y se ha especializado. Dichas reacciones pueden incluir la ruptura o formación de enlaces completamente diferentes a aquellos involucrados en la actividad nativa o bien, proceder a través de estados de transición completamente diferentes [16].

El *grado de promiscuidad* se refiere a la diversidad en las actividades promiscuas de una enzima dada y que tan diferentes son estas de su actividad nativa. El grado de promiscuidad puede ser evaluado mediante el análisis del tipo de enlaces que se forman o rompen, y las diferencias entre los mecanismos asociados a las reacciones nativa y promiscua [16].

La *magnitud de la promiscuidad* hace referencia a la diferencia entre los parámetros cinéticos de la reacción promiscua y la reacción nativa. Mientras la mayoría de las enzimas exhiben valores de k_{cat}/K_m en el orden de 10^5 - 10^8 $M^{-1}s^{-1}$ para sus sustratos nativos, la magnitud de las actividades promiscuas difiere en varios órdenes de reacción. La capacidad catalítica $((k_{cat}/K_m)_{k_{uncat}})$ y el aumento de la velocidad de reacción (k_{cat}/k_{uncat}) pueden proporcionar una medida de la magnitud de los efectos catalíticos ejercidos sobre los sustratos nativo y promiscuo. En muchos casos, aunque los valores de k_{cat}/K_m para los sustratos promiscuos son muy bajos el aumento en la velocidad de reacción y la capacidad catalítica llegan a ser considerablemente altos [16].

1.2.2 Actividad catalítica y mecanismos enzimáticos

Una tendencia creciente en enzimología apunta a que el estudio sistemático de las posibles actividades promiscuas puede proporcionar información valiosa sobre el

mecanismo de acción de la actividad nativa de una enzima dada[17]. Por ejemplo, el descubrimiento de la actividad promiscua de una ribozima de *Tetrahymena thermophila* sobre diésteres de fosfonato proporcionó información clave acerca de la importancia de la geometría del estado de transición sobre la carga de los sustratos [15]. Las dos diferencias clave entre la reacción nativa y la promiscua son la geometría del estado de transición y las cargas involucradas. Para evaluar la contribución de estos dos aspectos y entender el mecanismo catalítico de dicha ribozima, se estudió la reacción sobre un sustrato que carecía de una carga negativa pero compartía la geometría del estado de transición asociado al sustrato nativo. Los diésteres de fosfonato fueron hidrolizados con parámetros cinéticos similares a los de los diésteres de fosfato, demostrando que, en dichas reacciones, la geometría del estado de transición juega un papel de mayor importancia que la carga. Un estudio similar fue llevado a cabo por Olguín *et al* [21] encontrando que la arilsulfatasa de *Pseudomonas aeruginosa* además de hidrolizar monoésteres de sulfato (su actividad nativa) es capaz de hidrolizar monoésteres de fosfato. En esta ocasión las reacciones poseían geometrías y longitudes de enlace similares, pero diferían en la carga de los sustratos y en la identidad de los átomos involucrados en la ruptura/formación de enlaces.

1.2.3 Promiscuidad catalítica y evolución enzimática

Las superfamilias enzimáticas incluyen numerosas enzimas que, aunque distantes en secuencia, poseen un plegamiento y mecanismo catalítico compartidos. Los miembros de estas superfamilias catalizan diversas transformaciones químicas sobre diferentes sustratos, a través de un mecanismo catalítico común [16]. El análisis de superfamilias enzimáticas aporta la información más sólida y convincente acerca del papel de la promiscuidad en la evolución de nuevas funciones catalíticas. En concreto, la identificación de actividades promiscuas, o de reacciones cruzadas, entre los diferentes miembros de una misma familia enzimática, y la evolución dirigida de estas actividades, proporcionan pistas

importantes sobre las relaciones evolutivas, estructurales y mecánicas en dichas familias enzimáticas.

La evidencia experimental favorece el modelo de divergencia de una enzima progenitora "generalista" a una familia de enzimas "especializadas". La Figura 1.7 representa la hipótesis de Jensen [12], la cual propone que una proteína ancestral, que mostraba un nivel bajo de un amplio rango de actividades enzimáticas (denotadas como a, b, c, d), debió haber sido sometida a presiones evolutivas sobre dichas actividades, evolucionando paulatinamente, a través de duplicación y divergencia, en una familia de enzimas altamente especializadas con actividades nativas similares a las que vemos en la actualidad (denominadas A, B, C, D, etc.). Además, en el curso evolutivo ciertas actividades enzimáticas que no se encontraban presentes en el antepasado común pueden emerger como actividades nativas (denotadas como E y F). Hoy en día dichas enzimas especializadas pueden conservar también algunas de las funciones de su antepasado común (denotadas en minúsculas en las enzimas "especialistas"), mismas que son observadas como actividades promiscuas.

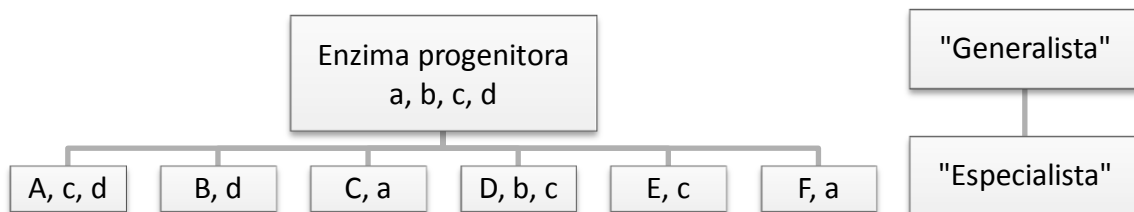


Figura 1.7 Hipótesis de Jensen sobre la divergencia de nuevos miembros en una familia enzimática.

Modificado de Khersonsky y Tawfik (2010) [15].

Los resultados de diversos experimentos de evolución dirigida respaldan el modelo propuesto por Jensen (Figura 1.8). Tras realizar mutaciones encaminadas a acentuar una actividad promiscua (flecha hueca), las variantes resultantes generalmente muestran un aumento en dicha actividad y una disminución en la actividad nativa, produciendo de este modo un intermediario tipo "generalista" que

exhibe ambas actividades a niveles relativamente altos (**b, d**) [15, 25], además, el intermediario puede adquirir también otras actividades diferentes a la actividad promiscua que se buscaba aumentar (a, c). Por el contrario obtener “Interruptores directos de especificidad”, aquellas mutaciones que transforman una enzima altamente especializada en otra igualmente especializada (flecha sólida), es poco común, y generalmente se observan después de una ardua selección de mutaciones que aumentan la actividad promiscua y eliminan la actividad nativa (flecha hueca punteada).

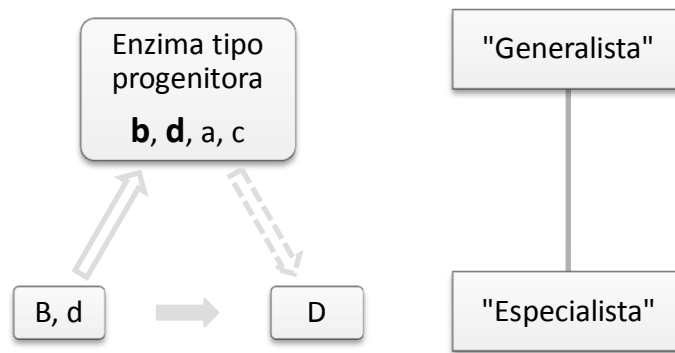


Figura 1.8 Evolución dirigida de nuevas funciones enzimáticas.
Modificado de Khersonsky y Tawfik (2010) [15].

A través del análisis de diversos ejemplos de promiscuidad catalítica dentro de varias familias enzimáticas y basando en la hipótesis propuesta por Jensen, Khersonsky & Tawfik [16] han propuesto las siguientes observaciones:

- A) La actividad nativa de un miembro de una familia enzimática generalmente es la actividad promiscua de otro miembro de la misma familia.
- B) La misma actividad promiscua generalmente es compartida por varios miembros de la familia enzimática.
- C) La magnitud de la promiscuidad catalítica varía considerablemente entre miembros de la misma familia enzimática.
- D) La evolución dirigida de una actividad promiscua generalmente provoca, indirectamente, la aparición de otras actividades promiscuas obteniendo intermediarios “generalistas”.

Las trayectorias evolutivas que parecen llevar de una función enzimática a otra tienden a ser graduales (una mutación a la vez) y suaves (a través de intermediarios que comparten cierto grado de funcionalidad o conformación). Sin embargo para que una actividad promiscua pueda funcionar como el punto de inicio para una nueva actividad enzimática se deben cumplir ciertos parámetros[17]:

- A) La actividad promiscua debe proveer una ventaja fisiológica inmediata para poder ser seleccionada o reclutada.
- B) Una vez que la actividad promiscua se vuelve fisiológicamente relevante, ésta puede ser incrementada a través de una, o pocas, mutaciones, inicialmente sin eliminar la actividad nativa de la enzima.
- C) El proceso de divergencia puede ser completado para dar origen a una nueva enzima especializada en la cual la actividad promiscua inicial se ha convertido en la actividad nativa.

En resumen, la promiscuidad catalítica es un fenómeno ampliamente distribuido cuyo estudio brinda información relevante sobre diversos aspectos de la catálisis enzimática como los mecanismos involucrados en las reacciones nativas de las enzimas actuales, la evolución de nuevas actividades enzimáticas en la naturaleza y en el laboratorio, a través de experimentos de evolución dirigida, entre otros.

2. Justificación

La enorme capacidad de las enzimas para acelerar la velocidad de un proceso químico se explica generalmente por su habilidad para unir y estabilizar el estado de transición de una reacción. Sin embargo, el mecanismo exacto de cómo esto ocurre sigue siendo motivo de diversas investigaciones. En el presente trabajo se estudió a la tRNasa Z de *E. coli*, caracterizando su actividad nativa y determinando la presencia de actividades promiscuas por medio de cinética enzimática. La promiscuidad catalítica es la capacidad de las enzimas para romper y formar enlaces químicos de distinta naturaleza a los que se encuentran en sus sustratos fisiológicos, su estudio permite comparar y analizar el proceso de estabilización de distintos estados de transición por una misma enzima.

Aunque los sustratos fisiológicos de la tRNasa Z son las moléculas de pre-tRNA, es posible evaluar su actividad nativa (fosfodiesterasa), a través de la hidrólisis del bis-*p*-nitrofenil fosfato (bpNPP) ya que ambos poseen un enlace fosfodiéster que es sujeto de hidrólisis por la tRNasa Z (Figura 2.1 y Figura 2.2).

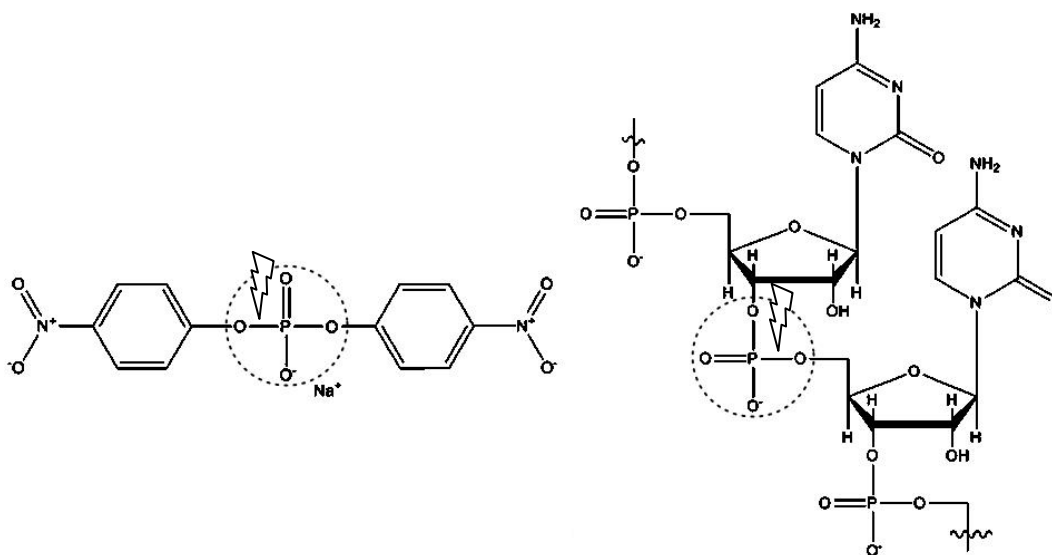


Figura 2.1 Enlaces fosfodiéster susceptibles de hidrólisis mediante la tRNasa Z en las moléculas de bpNPP (izquierda) y RNA (derecha).

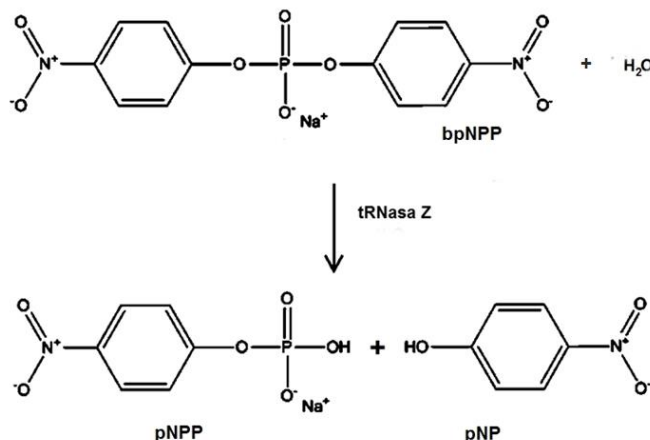


Figura 2.2 Reacción para el estudio de la actividad nativa.

El *p*-nitrofenol (pNP) se detecta mediante espectrofotometría UV-Visible a 400 nm.

La actividad de monofosfatasa, sobre el *p*-nitrofenil fosfato (pNPP), y la de sulfatasa, sobre el *p*-nitrofenil sulfato (pNPS), se estudiaron como posibles actividades promiscuas de la tRNasa Z debido a las similitudes estructurales y de geometría que poseen con los sustratos nativo (pre-tRNA) y modelo (bpNPP).

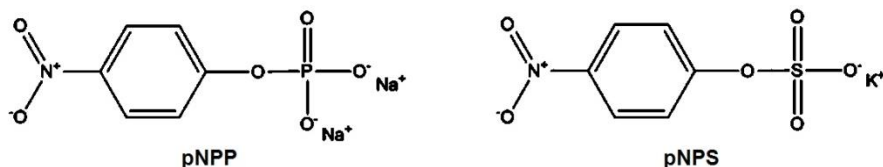


Figura 2.3 Sustratos promiscuos propuestos.

Además de participar en la maduración de pre-tRNAs, varios estudios sugieren que la tRNasa Z posee funciones adicionales relacionadas con el metabolismo de mRNA o rRNA, la función mitocondrial, entre otros. Las mutaciones en el gen de la tRNasa Z^L humana (ELAC2) han sido relacionadas con la prevalencia del cáncer de próstata y se ha demostrado que interactúa con la γ -tubulina. El estudio de las actividades promiscuas de la tRNasa Z puede brindar información sobre sus posibles funciones adicionales y el mecanismo enzimático involucrado en ellas.

3. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Clonar y purificar a la tRNasa Z de *E. coli* para determinar, mediante espectrofotometría UV-Visible, los parámetros cinéticos asociados a su actividad nativa (fosfodiesterasa) y sus posibles actividades promiscuas (monofosfatasa y sulfatasa).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonar el gen de la tRNasa Z de *E. coli* entre los sitios de restricción NdeI y XhoI del plásmido pET-28c.
- Determinar las mejores condiciones de sobreexpresión de la tRNasa Z y establecer un método adecuado para su purificación.
- Caracterizar la actividad nativa de fosfodiesterasa de la tRNasa Z.
- Determinar la existencia de actividades promiscuas (monofosfatasa y sulfatasa) de la tRNasa Z y caracterizar aquella o aquellas que estuviesen presentes.

4. Hipótesis

Si la tRNasa Z de *E. coli* posee actividad promiscua de monofosfatasa o sulfatasa ésta será capaz de hidrolizar uno o ambos sustratos promiscuos propuestos (ρ -nitrofenil fosfato y ρ -nitrofenil sulfato) debido a las similitudes estructurales y de geometría que poseen con su sustrato nativo (pre-tRNA).

5. Material y métodos

5.1 Clonación

5.1.1 PCR

La amplificación del gen que codifica para la tRNasa Z de *E. coli* se llevó a cabo mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), realizando dos reacciones subsecuentes.

Las secuencias del gen de interés (GeneID: 946760), del plásmido (pET-28c), de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción (*NcoI*, *NdeI*, *BglI* y *XhoI*) y del sitio de reconocimiento para la proteasa TEV (MENLYFQG) se obtuvieron a partir de diversas bases de datos como NCBI, UNIPROT y las páginas Fermentas, Novagen y NEB. Los oligonucleótidos para las reacciones de PCR se diseñaron utilizando el programa Serial Cloner 2.5 (Serial Software), con el cual también se simuló dichas reacciones antes de llevarlas a cabo experimentalmente.

En la primera reacción (PCR 1) se amplificó la región correspondiente al gen de la tRNasa Z y se adicionó, mediante el oligonucleótido Reverse, el sitio de corte para la enzima de restricción *XhoI*(5'-CTCGAG-3') en el extremo 3'. Para llevar a cabo dicha reacción se utilizó como templado el DNA genómico de *E. coli*/BL21(DE3) extraído mediante el método de Chen & Kuo[4] y los oligonucleótidos Forward1 (5'-ATGGAATTAATTTTTTTAGGTAGGTA~~CTTCAGCCGGTGTGCCAACC~~-3') y Reverse(5' - TCGACTCGAGT~~TAAACGTTAAACA~~CGGTGAAATCATTGCGCCAG - 3'), con la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 5.1 Mezcla de reacción para PCR 1

Reactivo	Volumen (µL)
Agua	16
PCR Master Mix 2X (Fermentas)	25
DNA genómico extraído(100 ng/µL)	3
Oligonucleótido Forward 1 (5 µM)	3
Oligonucleótido Reverse (5 µM)	3
Taq DNA Polimerasa (1 U/µL)(Fermentas)	1
Total	50

La reacción de PCR involucró una desnaturalización inicial a 95°C/2min, seguida por 35 ciclos de 95°C/30s - 65°C/30s - 72°C/1min y un periodo final de extensión a 72°C/10min, llevados a cabo en un termociclador TC-3000 (Techne).

Para confirmar la extensión del fragmento amplificado (900 PB), el producto de la PCR1 se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE, utilizando una fuente de poder EC-300XL y una cámara para electroforesis B1A (Thermo Scientific). Posteriormente el producto de la reacción se purificó mediante el juego de reactivos comerciales QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen).

En la segunda reacción (PCR 2) se adicionó, mediante el oligonucleótido Forward 2, la secuencia que codifica para el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV y el sitio de corte para la enzima de restricción NdeI (5´- CATATG - 3´) en el extremo 5´. Para llevar a cabo dicha reacción se utilizó como templado el producto purificado de la PCR1 y los oligonucleótidos Forward2 (5´-GAATTCCATATG GAAAACCTGACTTCCAGGGTATGGAATTAATTTTTTTAGG-3´) y Reverse (5´-TCGACTCGAGTTAAACGTTAAACACGGTGAAATCATTCCG CCAG - 3´), con la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 5.2 Mezcla de reacción para PCR2

Reactivo	Volumen (μL)
Agua	28
Buffer KOD Hot Start 10x	5
dNTPs 2mM c/u	5
MgSO ₄ 25 mM	2
PCR 1 Purificada(30 ng/ μL)	3
Oligonucleótido Forward 2 (5 μM)	3
Oligonucleótido Reverse (5 μM)	3
KOD Hot Start Polimerasa(1 U/ μL) (Novagen)	1
Total	50

La reacción de PCR involucró una desnaturalización inicial a 94°C/2min, seguida por 35 ciclos de 94°C/15s - 65°C/1min - 72°C/1min y una extensión final a 72°C/10min.

El producto de la PCR 2 se analizó de manera análoga a la PCR 1. La banda correspondiente al inserto (NdeI-TEV-tRNase-XhoI \approx 1000pb) se extrajo del gel utilizando el juego de reactivos comerciales QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen).

5.1.2 Producción del plásmido pET-28c/ATPasa

Éste se produjo a partir de una cepa de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pET-28c/ATPasa, un plásmido pET28c que contenía, entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*, el gen de una ATPasa de aproximadamente 1500pb, el cual fue proporcionado por la Dra. Nuria Sánchez del Instituto de Química de la UNAM. Dicho plásmido se utilizó en lugar del plásmido comercial pET-28c ya que al ser digerido con las enzimas *NdeI* y *XhoI* genera, en un gel de agarosa, bandas bien definidas que pueden ser purificadas fácilmente para el plásmido digerido, el plásmido no digerido y la secuencia de la ATPasa. En cambio, al digerir el plásmido comercial pET-28c con las mismas enzimas, la diferencia entre las

bandas generadas para el plásmido digerido y no digerido es de apenas 80 pb dificultando su purificación.

Se inocularon 3 mL de medio LB con Kanamicina (LB-Kan)(50 mg/mL) con una colonia de la cepa transformada y se incubaron a 37°C durante 16 horas con agitación vigorosa (200rpm). Transcurrido el tiempo de incubación, el DNA plásmidico se extrajo utilizando el juego de reactivos comerciales QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen), la muestra de plásmido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE, para confirmar la extensión del plásmido.

5.1.3 Digestión

Tanto el plásmido pET-28c/ATPasa (50 ng/μL) como el inserto, producto de la PCR 2 (35 ng/μL), se sometieron a una reacción de doble digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI* (Fermentas), las condiciones de reacción se determinaron a través de la herramienta DoubleDigest™ de Fermentas, las mezclas de reacción utilizadas fueron las siguientes:

Tabla 5.3 Mezclas de reacción para doble digestión

Reactivo	Plásmido	Inserto
	Volumen (μL)	
Buffer O	3	4
Agua	4	9
DNA	20	28
<i>NdeI</i> (10 U/μL)	1	1
<i>XhoI</i> (10 U/μL)	2	2
Total	30	40

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 16 horas, posteriormente se sometieron a un ciclo de inactivación térmica a 80°C durante 20 minutos. El producto de las reacciones se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE para confirmar la eficiencia de la digestión; las bandas correspondientes al plásmido digerido (≈5000 pb) y al inserto digerido (≈1000 pb)

se extrajeron del gel. Con el fin de prevenir la recircularización del plásmido durante la ligación, la muestra correspondiente al plásmido digerido se trató con Fosfatasa Alcalina Termosensible FastAP (Thermo Scientific). La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

Tabla 5.4 Mezcla de reacción para desfosforilación

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer FastDigest 10X	3
Agua	6
Plásmido digerido(40 ng/ μL)	20
Fosfatasa Alcalina FastAP (1 U/ μL)	1
Total	30

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 10 minutos, posteriormente se sometió a un ciclo de inactivación térmica a 80°C durante 20 minutos.

5.1.4 Ligación y Transformación

Se llevó a cabo una reacción de ligación entre el plásmido digerido desfosforilado y el inserto digerido, utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (Fermentas) y una relación molar inserto:vector de 3:1. La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

Tabla 5.5 Mezcla de reacción para ligación

Reactivo	Volumen (μL)
Agua	28
Buffer T4 DNA Ligasa 10X	4
Inserto digerido (28 ng/ μL)	1.2
Plásmido digerido desfosforilado (27 ng/ μL)	2
T4 DNA Ligasa (1 U/ μL)	3
Total	50

La mezcla de reacción se incubó a 4°C durante 16 horas, al finalizar el tiempo de incubación ésta se purificó utilizando el juego de reactivos comerciales QIAquick

PCR Purification Kit (Qiagen), agregando en el paso final de elución dos volúmenes de 12,5 μL de Buffer EB de manera alternada.

La mezcla de ligación purificada se utilizó para transformar células ultra competentes de *E. coli* DH5 α , preparadas de acuerdo al método de Inoue [23]. Se agregaron 2 μL de la mezcla de ligación purificada a 50 μL de células ultra-competentes en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, éste se dejó reposar en hielo durante 30 minutos, se le proporcionó un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y se dejó reposar en hielo durante 5 minutos más. Posteriormente se adicionó 1 mL de medio SOB y la mezcla de transformación se incubó a 37°C durante una hora y media.

Transcurrido el tiempo de incubación la mezcla de transformación se utilizó para sembrar 3 placas de agar LB-Kan, cada una de las cuales recibió 500 μL , 300 μL y 200 μL respectivamente. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se buscaron colonias transformantes, cada colonia desarrollada en las placas se utilizó para inocular un tubo con 3 mL de medio LB-Kan, mismos que se incubaron a 37°C durante 16 horas con agitación vigorosa (200rpm). Transcurrido el tiempo de incubación se extrajo el DNA plasmídico de cada cultivo.

A cada una de las muestras de DNA plasmídico se le practicaron 3 patrones de digestión con las enzimas: NdeI+XhoI, BglI y NcoI (Fermentas). Las mezclas de reacción utilizadas para cada patrón fueron:

Tabla 5.6 Mezclas de reacción para patrones de digestión

Reactivo	NdeI+XhoI	BglI	NcoI
Volumen (μL)			
Agua	2	3.5	3.5
Buffer O	4	4	4
DNA(30 ng/ μL)	31	31	31
<i>NdeI</i> (10 U/ μL)	1.5	-	-
<i>XhoI</i> (10 U/ μL)	1.5	-	-
<i>BglI</i> (10 U/ μL)	-	1.5	-
<i>NcoI</i> (10 U/ μL)	-	-	1.5
Total	40	40	40

Las reacciones se incubaron durante 2 horas a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE y los patrones obtenidos se compararon con aquellos predichos por software Serial Cloner 2.5 para el plásmido recombinante.

A partir de una de las cepas que cumplió con los tres patrones de digestión, se preparó una muestra de plásmido recombinante a una concentración de 100ng/μL, parte de la cual fue enviada para su secuenciación a la compañía Laragen (EEUU). Al confirmarse que la secuencia del plásmido correspondía al plásmido recombinante esperado se transformaron cepas de *E.coli*BL21 (DE3) y *E. coli* C41(DE3) con la muestra de plásmido recombinante restante. Las cepas “DE3” se seleccionaron debido a que contienen el gen que codifica para la RNA polimerasa del virus T7, necesaria para la expresión de proteínas recombinantes bajo el sistema pET.

5.2 Purificación

5.2.1 Estudios de inducción

Se estudiaron dos condiciones de inducción con el fin de determinar aquella que fuese óptima para la producción de la proteína recombinante. Se utilizó una condición propuesta en el laboratorio (A) y una reportada en la literatura (B) [28], descritas en la Tabla 5.7.

Dichas condiciones diferían en la cepa productora, la concentración de inductor y el tiempo y temperatura de inducción. La cepa C41 se utilizó debido a que se ha documentado su alta capacidad de sobreexpresión de proteínas recombinantes utilizando el sistema de expresión asociado a la polimerasa del bacteriófago T7.

Tabla 5.7 Condiciones de inducción

Características	B	A
Cepa	E. coli C41(DE3)	E.coli BL21(DE3)
Inductor	IPTG 1mM	IPTG 0.1mM
Tiempo/Temperatura	4hrs / 30°C	16hrs / 25°C

Las cepas de *E. coli* - BL21(DE3) y C41(DE3) - transformadas con el plásmido recombinante se utilizaron para inocular, cada una, un tubo con 3mL de medio LB-Kan, el cual se incubó a 37°C durante 16 horas con agitación vigorosa. Transcurrido el tiempo de incubación, 60µL del cultivo se utilizaron para inocular un matraz de 125 mL que contenía 20mL de medio LB-Kan, el cual se incubó a 37°C con agitación vigorosa (200 rpm) durante varias horas hasta alcanzar una OD₆₀₀ de entre 0.6 y 0.8, momento en el cual se adicionó el IPTG y se establecieron las condiciones de temperatura y tiempo de incubación necesarias en cada caso.

Para la estrategia de inducción A se tomaron muestras de 1 mL de medio de cultivo a tiempo 0, 1, 2 y 4 horas; para la estrategia de inducción B se tomaron muestras de 1 mL de medio de cultivo a tiempo 0, 2, 4 y 16 horas. Al momento de tomar cada muestra se determinaba su OD₆₀₀, se centrifugaba a 13000rpm durante un minuto, se retiraba el sobrenadante y se almacenaba el pellet de células a -20°C. Una vez obtenido el total de muestras, la proteína recombinante se extrajo de ellas a través del método de Jhonson & Hecht[13].

Las muestras de proteína recombinante se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10% (SDS-PAGE) utilizando una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad) y una fuente de poder PowerPac® Basic (Bio-Rad) aplicando un voltaje de 120V durante 120 minutos. De acuerdo a los resultados obtenidos en el gel, se seleccionaron las mejores condiciones para producir la proteína recombinante a nivel matraz.

La producción de la proteína recombinante a nivel matraz se realizó utilizando las condiciones óptimas encontradas, *E. coli* C41 (DE3), IPTG 1 mM y 30°C/4hrs, siguiendo la metodología descrita previamente para los estudios de inducción, pero en este caso el volumen de medio de cultivo fue de 500mL en un

matraz Erlenmeyer de 2L. Transcurrido el tiempo de inducción las células se recuperaron mediante centrifugación a 10000rpm durante 3 minutos en una centrifuga Heraeus Megafuge 16 (Thermo Scientific), se desechó el sobrenadante y los pellets de células se almacenaron a -20°C. Al día siguiente los pellets se resuspendieron en 20mL de Buffer de Lisis(NaCl500mM, Imidazol20mM, Tris-HCl 50mM pH 7.5), la muestra se sonicó en un sonicador Sonicator® 3000 (Misonix) en ciclos alternados de sonicado(15s)/reposito(30s) a una potencia de 4 W hasta alcanzar 8 minutos de sonicación. Posteriormente la muestra se centrifugo a 15000rpm durante 45 minutos a 4°C en una centrifuga J-QA27 (Beckman Coulter), se desechó el pellet y el sobrenadante (extracto crudo) se almacenó a 4°C hasta su purificación.

5.2.2 Cromatografía de afinidad

El extracto crudo (≈ 20mL) se dividió en 5 fracciones de 4 mL, cada una de las cuales se aplicó de manera alternada en una columna His-Trap® FF de 1mL (GE Healthcare) equilibrada previamente con 3 mL de Buffer de Lisis, en cada inyección la columna se lavó con 3mL adicionales de Buffer de Lisis y la fracción retenida se eluyó con 3mL de Buffer de Elución (NaCl500mM, Imidazol250mM, Tris-HCl50mM pH 7.5). Las fracciones eluidas se mezclaron y se aplicaron en un filtro para centrífuga Amicon® Ultra 30K (Millipore) con el fin de intercambiar el Buffer de Elución por Buffer de Unión (Tris-HCl 20mM pH 7.6) para cromatografía de intercambio iónico. El filtro se centrifugó a 8500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga Heraeus Megafuge 16 (Thermo Scientific), se agregaron 15 mL de Buffer de Unión, se centrifugó nuevamente a 8500 rpm durante 10 minutos, se agregaron 15 mL adicionales de Buffer de Unión y se centrifugó nuevamente a 8500 rpm durante 10 minutos.

5.2.3 Digestión con proteasa TEV

Con el fin de analizar la eficiencia de la digestión de la proteína recombinante tRNasa Z, 1mL (6 mg/mL) de la muestra de proteína y 3 mL (2 mg/mL) del péptido

control se trataron, cada uno, con 200 μ L de proteasa TEV (1.2 mg/mL) en un volumen de reacción de 3.5 mL, evaluando la reacción en dos buffers distintos: A (NaCl 250mM, Tris-HCl 250 mM pH 8) y B (EDTA 0.5 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8). Las mezclas de reacción se incubaron a 25 °C durante dos horas, al término del período de incubación las muestras se purificaron mediante cromatografía de afinidad y las fracciones inicial, retenida y no retenida se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10%. La cromatografía de afinidad se llevó a cabo ya que la proteasa TEV retira de la proteína recombinante la secuencia del His-tag, por lo que si la proteína ha sido digerida, no podrá unirse a la columna y se encontrará en la fracción no retenida. En cambio, si ésta no ha sido digerida, podrá unirse a la columna y finalmente se encontrará en la fracción eluída.

Debido a que la eficiencia de corte fue prácticamente nula se decidió trabajar con la tRNasa Z completa, es decir con las secuencias de aminoácidos correspondientes al His-tag y el sitio de reconocimiento para TEV en el extremo N-terminal. A la muestra de proteína recombinante que no fue tratada con la proteasa TEV se le intercambi6 el Buffer TEV por Buffer de Unión (Tris-HCl 20 mM pH 7.6) para cromatografía de intercambio i6nico, siguiendo el procedimiento descrito previamente.

5.2.4 Cromatografía de intercambio i6nico

Para llevar a cabo la cromatografía de intercambio i6nico se utiliz6 el sistema de HPLC Shimadzu Serie 20 con Detector UV (Shimadzu) y una columna HiTrap Q HP de 1mL (GE Healthcare).

La columna se equilibr6 con 5 mL de Buffer de Unión a un flujo de 1 mL/min, posteriormente se inyect6 la muestra de proteína recombinante y ésta se eluy6 siguiendo el programa que se describe a continuación:

**Tabla 5.8 Programa para cromatografía de intercambio iónico
(A un flujo de 1mL/min)**

Etapa			Tipo de buffer (%)	
Nombre	Inicio	Término	Buffer de Unión	Buffer de Intercambio
Lavado A	0 min	5 min	100	0
Gradiente Unión-Intercambio	5 min	25 min	De 100 a 0	De 0 a 100
Lavado B	25 min	30 min	0	100
Gradiente Intercambio-Unión	30 min	31 min	De 0a 100	De 100a 0
Re-equilibrio	31 min	35 min	100	0

Fracciones representativas de cada región del cromatograma se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10%. De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron las fracciones que contenían a la proteína recombinante en mayor cantidad y pureza, éstas se mezclaron y se realizó intercambio de Buffer de Intercambio (NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.6) por Buffer de Ensayo (Tris-HCl 200 mM pH 7.4) [28].

5.3 Caracterización cinética

5.3.1 Actividad nativa

El estudio de la actividad nativa (fosfodiesterasa) de la tRNAsa Z sobre el sustrato bis- ρ -nitrofenil fosfato (bpNPP) se llevó a cabo mediante ensayos espectrofotométricos continuos, monitoreando la formación de ρ -nitrofenol.

Utilizando un espectrofotómetro Cary Win 50 (Varian) se obtuvieron los espectros del sustrato (bpNPP) y el producto (ρ -nitrofenol) a una concentración 100 nM para identificar sus máximos de absorción y garantizar que éstos no se solapasen considerablemente.

Con el fin de conocer el coeficiente de absorptividad molar a 400 nm (ϵ_{400nm}) del ρ -nitrofenol, se preparó una curva patrón, utilizando solución esestándar de concentración 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M y 50 μ M en Buffer de Ensayo. Los valores de absorbancia de las soluciones a 400 nm se obtuvieron a partir de espectros de absorción efectuados en un rango de 300-500 nm. El valor de ϵ_{400nm} se determinó a partir de la pendiente de la gráfica de absorbancia a 400 nmen función de la concentración de ρ -nitrofenol.

Para analizar la dependencia de la velocidad inicial de la reacción respecto a la cantidad de enzima así como la estabilidad de la enzima durante el curso de la reacción, se realizaron tres ensayos cinéticos a una concentración 2 mM de sustrato (bpNPP) y diferentes concentraciones de enzima, según se indica en la tabla 5.9:

Tabla 5.9 Estudio de la velocidad inicial y estabilidad enzimática para actividad nativa.

	Concentración final de enzima		
	1 nM	2 nM	3 nM
Reactivo	Volumen (μ L)		
Buffer de Ensayo	128	118	98
bpNPP (25mM)	12	12	12
Enzima (15 nM)	10	20	30
Total	150	150	150

La absorbancia se monitoreó en un rango de 300-500 nm cada medio minuto durante 30 minutos. Posteriormente se calculó la velocidad inicial de cada reacción, en nm/s , utilizando la pendiente de las gráficas de absorbancia $_{400nm}$ en función del tiempo, como indica la ecuación 5.1:

Ecuación 5.1 Cálculo de la velocidad inicial

$$V_0 = \frac{m_{Abs_{\lambda}}(min^{-1}cm^{-1})}{\epsilon(M^{-1}cm^{-1})} \cdot \frac{1 min}{60 s} \cdot \frac{1 \times 10^9 nM}{1 M}$$

Para corroborar que el aumento de absorbancia a 400 nm se debía a la actividad enzimática sobre el sustrato y no a un fenómeno físico (evaporación, por ejemplo), se efectuó un ensayo cinético a una concentración 15 nM de enzima y 100 nM de sustrato para determinar la existencia de un punto isobéptico en el espectro de la reacción durante el curso del ensayo. La absorbancia se monitoreó en un rango de 300-500 nm cada cinco minutos durante dos horas y cada 30 minutos durante 10 horas más, los espectros de absorción de la mezcla de reacción a diferentes tiempos se representaron en una misma gráfica.

Para determinar los parámetros cinéticos asociados a la actividad nativase efectuaron, por triplicado, diversos ensayos a una concentración 3 nM de enzima y diferentes concentraciones de sustrato (bpNPP), según se indica en la Tabla 5.10:

Tabla 5.10 Ensayos cinéticos para actividad nativa

Reactivo	Concentración final de sustrato (bpNPP)						
	0.25 mM	0.5 mM	1 mM	2 mM	4 mM	8 mM	12 mM
	Volumen (μ L)						
Buffer de Ensayo	133.5	132	129	123	111	87	63
bpNPP (25 mM)	1.5	3	6	12	24	48	72
Enzima (15 nM)	15	15	15	15	15	15	15
Total	150	150	150	150	150	150	150

La absorbancia se monitoreó en un rango de 300-500 nm cada medio minuto durante 30 minutos, posteriormente se calculó la velocidad inicial de cada reacción, en nm^M/s , como se indicó previamente. Los valores de velocidad inicial obtenidos se analizaron mediante el programa Graphpad Prism® versión 6.01 (Graphpad Software), realizando una comparación entre el ajuste al modelo de Michaelis-Menten y el ajuste al modelo de Hill (Allosteric Sigmoidal, según el programa).

5.3.2 Actividad promiscua

El estudio de las actividades promiscuas de monofosfatasa y sulfatasa de la tRNAse Z sobre los sustratos *p*-nitrofenil fosfato (pNPP) y *p*-nitrofenil sulfato (pNPS) se llevó a cabo mediante ensayos espectrofotométricos continuos, monitoreando la formación de *p*-nitrofenol.

Se obtuvieron los espectros de los sustratos (pNPP y pNPS) y el producto (*p*-nitrofenol) a una concentración 100 nM para identificar sus máximos de absorción y garantizar que estos no se solapasen considerablemente.

Debido a que a altas concentraciones de los sustratos se tiene la presencia de un porcentaje de *p*-nitrofenol libre que dificulta el seguimiento de las reacciones mediante el cambio de la absorbancia a 400 nm, se decidió monitorear los ensayos cinéticos a 410 nm, para lo cual se utilizaron los datos de la curva patrón descrita en la Sección 5.3.1 para calcular el coeficiente de absortividad molar a 410 nm (ϵ_{410nm}) a partir de la pendiente de la gráfica de absorbancia a 410 nm en función de la concentración de *p*-nitrofenol.

Para analizar la dependencia de la velocidad inicial de las reacciones promiscuas respecto a la cantidad de enzima agregada así como la estabilidad de la enzima durante el curso de dichas reacciones, se realizaron tres ensayos cinéticos para cada sustrato (pNPP y pNPS) a una concentración 20 mM de los mismos y diferentes concentraciones de enzima, como se indica en la Tabla 5.11:

Tabla 5.11 Estudio de la velocidad inicial y estabilidad enzimática para actividades promiscuas

Reactivo	Concentración final de enzima					
	0.5 μ M	1.0 μ M	1.5 μ M	0.5 μ M	1.0 μ M	1.5 μ M
Buffer de ensayo	97	92	87	97	92	87
pNPP (62.5mM)	48	48	48	-	-	-
pNPS (62.5 mM)	-	-	-	48	48	48
Enzima (15 μ M)	5	10	15	5	10	15
Total	150	150	150	150	150	150

La absorbancia se monitoreó en un rango de 300-500 nm cada cinco minutos durante dos horas y los datos de absorbancia a 410 nm se analizaron de manera análoga a aquellos obtenidos a 400 nm para la actividad nativa. Únicamente las reacciones con pNPP mostraron evidencia de actividad enzimática, por lo cual solamente se determinaron los parámetros cinéticos asociados a la actividad de monofosfatasa.

Para determinar los parámetros cinéticos asociados a la actividad promiscua monofosfatasa se efectuaron, por triplicado, ensayos a una concentración 1.2 μM de enzima y diferentes concentraciones de sustrato (pNPP), según se indica en la Tabla 5.12:

Tabla 5.12 Ensayos cinéticos para actividad promiscua

Reactivo	Concentración final de sustrato (pNPP)				
	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM
	Volumen (μL)				
Buffer de Ensayo	111	87	63	39	15
pNPP (62.5 mM)	24	48	72	96	120
Enzima (12 μM)	15	15	15	15	15
Total	150	150	150	150	150

La absorbancia se monitoreó en un rango de 300-500 nm cada 5 minutos durante 2 horas, posteriormente se calculó la velocidad inicial de cada reacción, en nm/s , utilizando la pendiente de las gráficas de absorbancia_{410nm} en función del tiempo, según se indica en la Ecuación 4.1. Los valores de velocidad inicial obtenidos se analizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito para la actividad nativa.

6. Resultados y discusión

6.1 Clonación

6.1.1 PCR

La amplificación del gen de la tRNasa Z de *E. coli* (Tabla 6.1) se llevó a cabo mediante PCR, realizando dos reacciones subsecuentes.

Tabla 6.1 Secuencia del gen de la tRNasa Z de *E.coli*/BL21 (GeneID: 946760)

```
ATGGAATTAATTTTTTAGGTACTTCAGCCGGTGTGCCAACCCGCACGCGCAATGTCACGGCAA
TATTGCTTAACCTGCAACATCCGACCCAGAGCGGACTTTGGTTGTTTGACTGCGGTGAAGGCA
CCCAGCATCAGCTACTGCATACCGCCTTTAACCCCTGGAAAACCTGGACAAGATTTTTATCAGTCA
CCTTCATGGCGATCATCTTTTTGGTTTACCCGGCTTGCTGTGCAGTCGTTCTATGTCAGGCATT
ATCCAACCCTTAACGATTTATGGTCCGCAAGGTATCCGTGAATTTGTGGAAACCGCGCTGCCG
ATTAGCGGCTCATGGACCGATTATCCGCTGGAAATTGTCGAAATTGGCGCTGGCGAAATTCTC
GATGATGGCCTGCGCAAAGTAACCGCTTATCCGCTGGAACACCCACTGGAATGTTATGGCTAT
CGTATTGAAGAACATGATAAACCGGGTGCATTAATGCCAGGCATTAAGCTGCTGGCGTG
CCGCTGGCCCACTGTTTCAGGAATTAAGCGGGCAAACAATCACGCTGGAAGATGGAAGG
CAGATTAACGGCGCAGATTACTTAGCTGCTCCAGTGCCAGGTAAAGCGCTCGCTATTTTCGGC
GATACCGGCCCTGCGATGCCGCACTTGACCTGGCTAAAGGTGTCGATGTCATGGTGCACGA
AGCGACGCTGGATATAACCATGGAAGCCAAAGCCAATAGTCGCGGCCATAGCTCTACACGCCA
GGCTGCGACACTAGCCCGTGAGGCTGGAGTCGGCAAGCTAATCATTACCCACGTCAGCTCGC
GCTATGATGACAAAGTTGTGAGCACCTGTTACGTGAATGCAGGTCAATTTTCCCGGCGACTG
AACTGGCGAATGATTTACCCGTGTTAACGTTTAA
```

En la PCR 1 (Figura 6.1 A) se amplificó el gen de la tRNasa Zy se adicionó el sitio de corte para *XhoI*. En la PCR 2 (Figura 6.1 B) se adicionó la secuencia que codifica para el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV y el sitio de corte para la enzima de restricción *NdeI*.

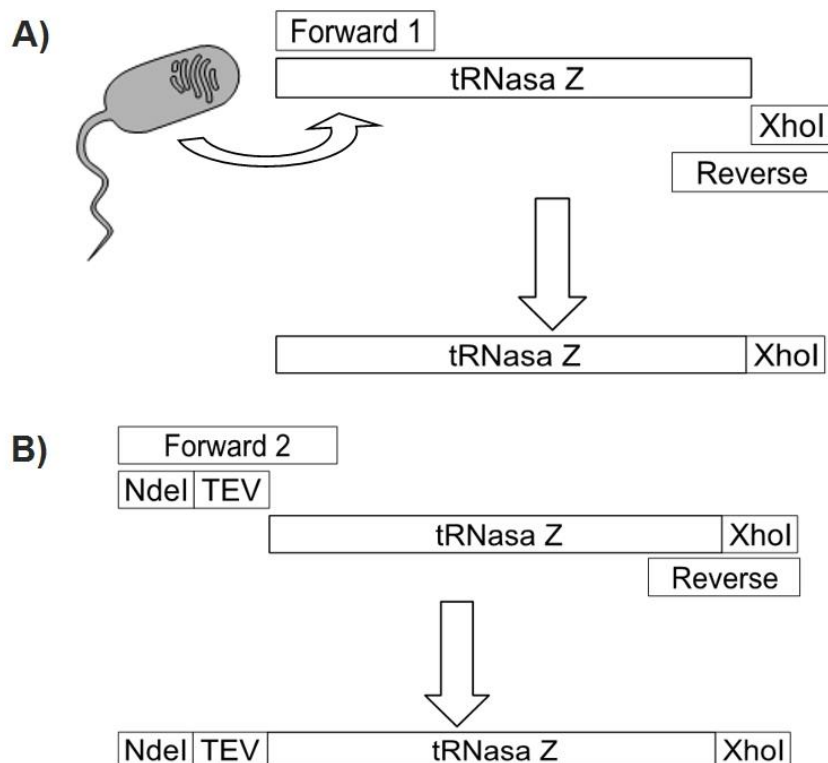


Figura 6.1 Esquema de las reacciones de PCR.

A) PCR 1. B) PCR 2.

El oligonucleótido Reverse contiene la secuencia del sitio de corte de la enzima *XhoI* y el oligonucleótido Forward 2 contiene la secuencia del sitio de corte de la enzima *NdeI* y la secuencia que codifica para el sitio de corte de la proteasa TEV.

Al analizar el producto de las reacciones de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, es posible observar que la PCR 1 genera una banda que corresponde a la longitud esperada (928 pb) para el gen de la tRNase Z más la secuencia agregada mediante el oligonucleótido Reverse. La PCR 2 genera una banda de un tamaño ligeramente mayor, que corresponde a la longitud esperada (960 pb) debido a las secuencias que se adicionan en dicha reacción mediante el oligonucleótido Forward 2, por lo cual se procedió a clonar el producto de la PCR2 en el plásmido pET-28c.

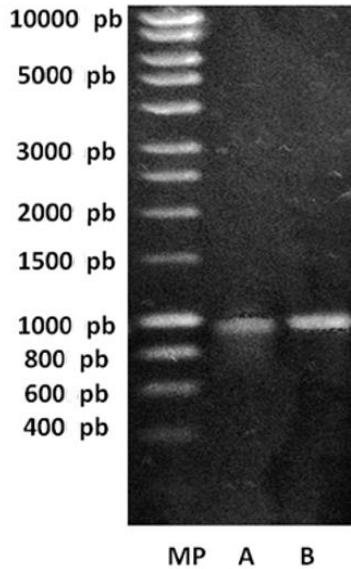


Figura 6.2 Reacciones de PCR efectuadas.
 MP) Marcador de peso. A) PCR 1. B) PCR2.

6.1.2 Producción del plásmido pET-28c/ATPasa

Se obtuvo a partir de una cepa de *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pET-28c/ATPasa, al analizar el plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 5.3), se observa una banda bien definida cercana a 6000 pb, el hecho de que el plásmido migre a una longitud menor a la que corresponde a sus extensión (\approx 6700 pb) puede deberse a que se encuentra superenrollado.

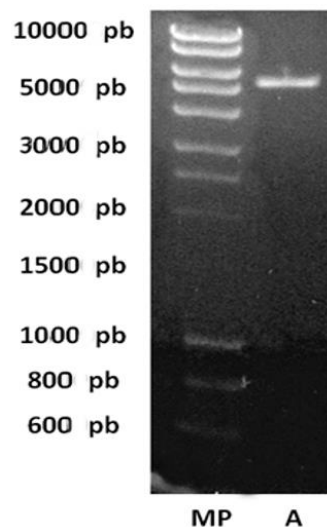


Figura 6.3 Purificación del plásmido pET-28c/ATPasa.
 MP) Marcador de peso. A) Plásmido pET-28c/ATPasa.

6.1.3 Digestión

Tanto el plásmido pET-28c/ATPasa como el inserto (producto de la PCR 2) se sometieron a una reacción de doble digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. Al analizar el producto de ambas reacciones mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 5.4), es posible observar que la digestión del inserto genera solamente una banda ligeramente debajo de 1000 pb, ya que la reacción remueve pocos pares de bases de los extremos 5' y 3' de dicha secuencia. En cambio, la digestión del plásmido genera dos bandas ya que el primer corte provoca que el plásmido se linearice mientras el segundo divide la secuencia en dos fragmentos: el primero (≈ 5000 pb) corresponde al plásmido pET-28c y el segundo (1500 pb) corresponde a la secuencia de la ATPasa que contenía el plásmido.

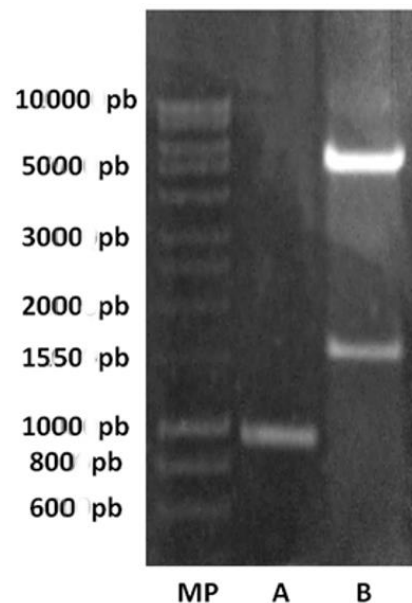


Figura 6.4 Digestión del plásmido pET-28c/ATPasa y el inserto con las enzimas *NdeI* y *XhoI*.

MP) Marcador de peso A) Inserto digerido. B) Plásmido pET-28c/ATPasa digerido.

Las bandas correspondientes al plásmido digerido (≈ 5000 pb en el carril B) y al inserto digerido (≈ 1000 pb en el carril A) se extrajeron y purificaron. Finalmente la muestra correspondiente al plásmido digerido se trató con Fosfatasa Alcalina FastAP para evitar su recircularización durante la reacción de ligación.

6.1.4 Ligación y Transformación

Se llevó a cabo una reacción de ligación entre el plásmido digerido defosforilado y el inserto digerido utilizando una relación molar inserto:vector de 3:1. La mezcla de ligación se purificó y se utilizó para transformar células ultra competentes de *E. coli* DH5 α , obteniendo 8 colonias transformantes, de las cuales se obtuvieron muestras de plásmido a las que se les practicaron tres patrones de digestión, mismos que se compararon con aquellos predichos por el software Serial Cloner 2.5 para el plásmido recombinante.

Al analizar, mediante electroforesis en gel de agarosa, los patrones de digestión obtenidos con las enzimas *Nde*I y *Xho*I (Figura 6.5), es posible observar que solo 5 (A, D, F, G y H) de las 8 muestras de plásmido cumplen con el patrón predicho (bandas a 5290 pb y 945 pb) y, por tanto, contienen entre los sitios *Nde*I y *Xho*I una secuencia de \approx 1000 pb que puede corresponder al inserto.

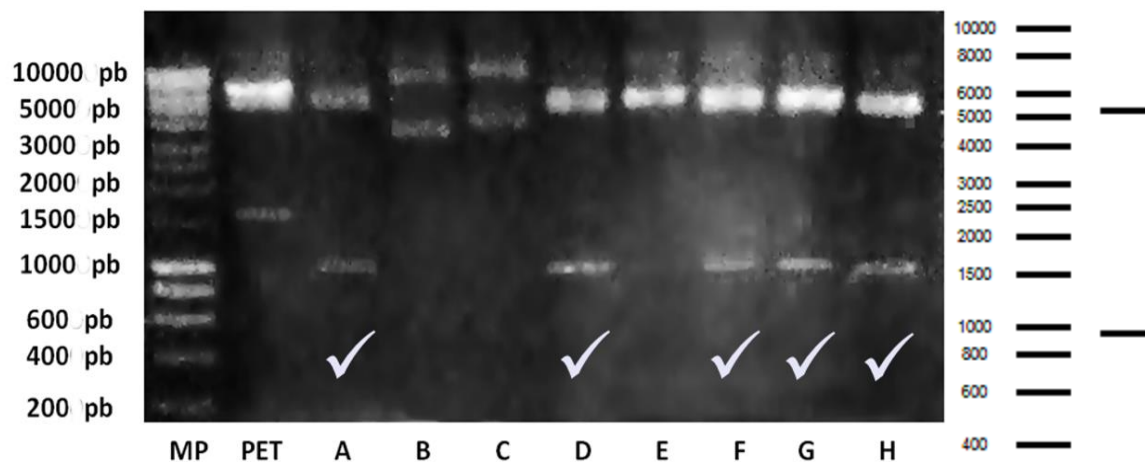


Figura 6.5 Análisis de restricción de las muestras de plásmido recombinante con las enzimas *Nde*I y *Xho*I.

PET corresponde al plásmido pET-28c/ATPasa. Se señalan las muestras que cumplen con el patrón predicho por el software Serial Cloner 2.5 (Serial Software), mismo que se muestra del lado derecho de la figura.

Al analizar los patrones de digestión obtenidos con la enzima *Bgl*II (Figura 6.6), es posible observar que solamente 4 (A, D, G y H) de las 5 muestras de plásmido que cumplieron con el primer patrón de digestión cumplen con el segundo (bandas a

2747 pb y 3488 pb), por lo cual solo dichas muestras pueden corresponder al plásmido recombinante esperado.

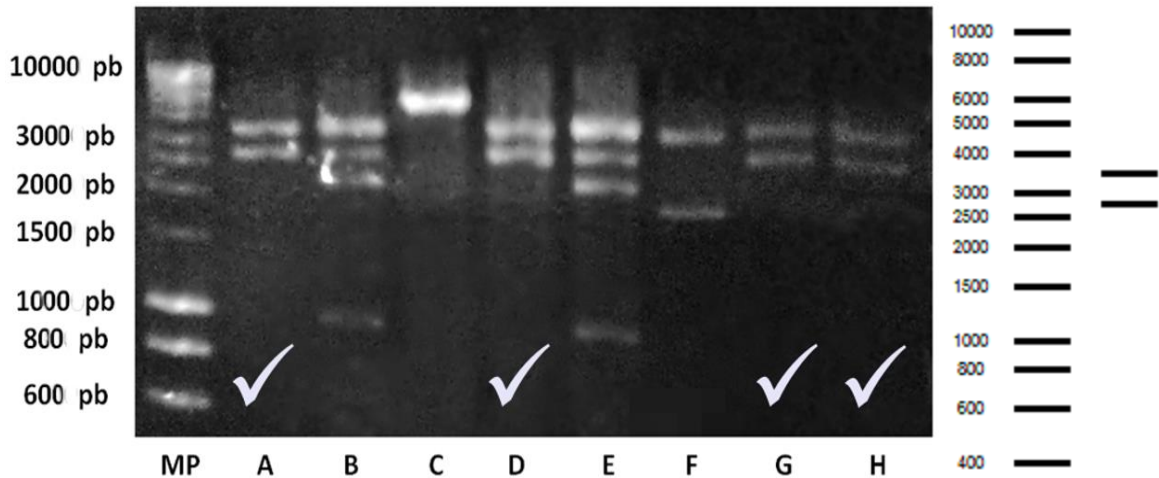


Figura 6.6 Análisis de restricción de las muestras de plásmido recombinante con la enzima *BglI*.

Se señalan las muestras que cumplen con el patrón predicho por el software Serial Cloner 2.5 (Serial Software), mismo que se muestra del lado derecho de la figura.

Al analizar los patrones de digestión obtenidos con la enzima *NcoI* (Figura 6.7), es posible observar que solamente 3 (A, D y H) de las 4 muestras de plásmido que cumplieron con el primer y segundo patrón de digestión cumplen también con el tercero (bandas a 5437 pb y 798 pb), indicando que solo estas 3 muestras de plásmido corresponden al plásmido recombinante.

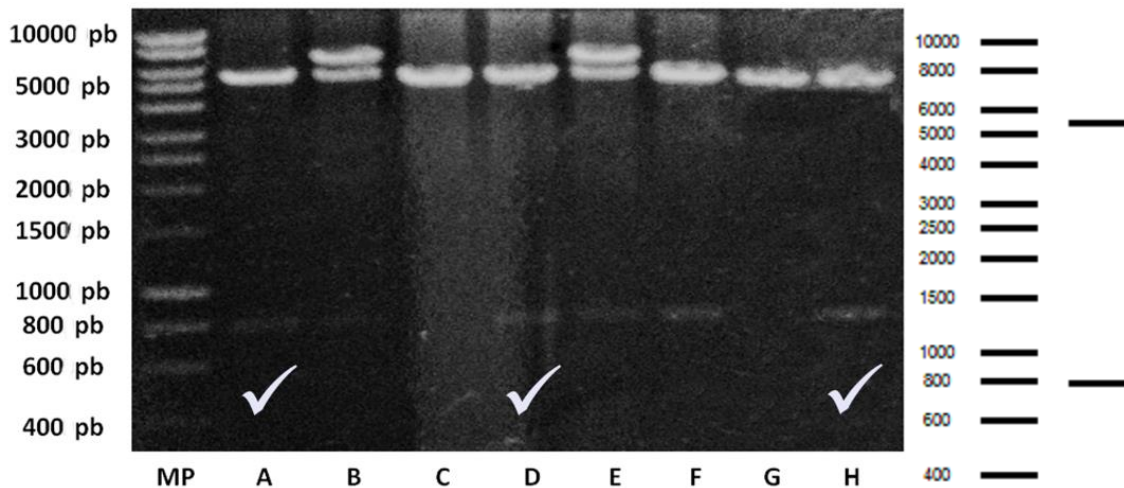


Figura 6.7 Análisis de restricción de las muestras de plásmido recombinante con la enzima *NcoI*.

Se señalan las muestras que cumplen con el patrón predicho por el software Serial Cloner 2.5 (Serial Software), mismo que se muestra del lado derecho de la figura.

La muestra de plásmido A, que cumplió con los tres patrones de digestión, se envió para su secuenciación a la compañía Laragen (EEUU). Los resultados obtenidos (Anexos: Figura 9.1 y 9.2) confirmaron que la clonación había sido exitosa. El plásmido recombinante se identificó como pOH1 y se utilizó para transformar cepas de *E.coli* BL21(DE3) y *E. coli* C41(DE3).

5.2 Purificación

5.2.1 Estudios de inducción

Se estudiaron dos condiciones de inducción, una propuesta en el laboratorio (A) y una reportada en la literatura (B) (28), las cuales diferían en la cepa productora, la concentración de inductor y el tiempo y temperatura de inducción. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de inducción y la proteína recombinante se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Figura 6.8). Se decidió utilizar la condición de inducción A para la producción de la tRNasa Z ya que con esta se obtiene una mayor cantidad de proteína recombinante en un menor tiempo.

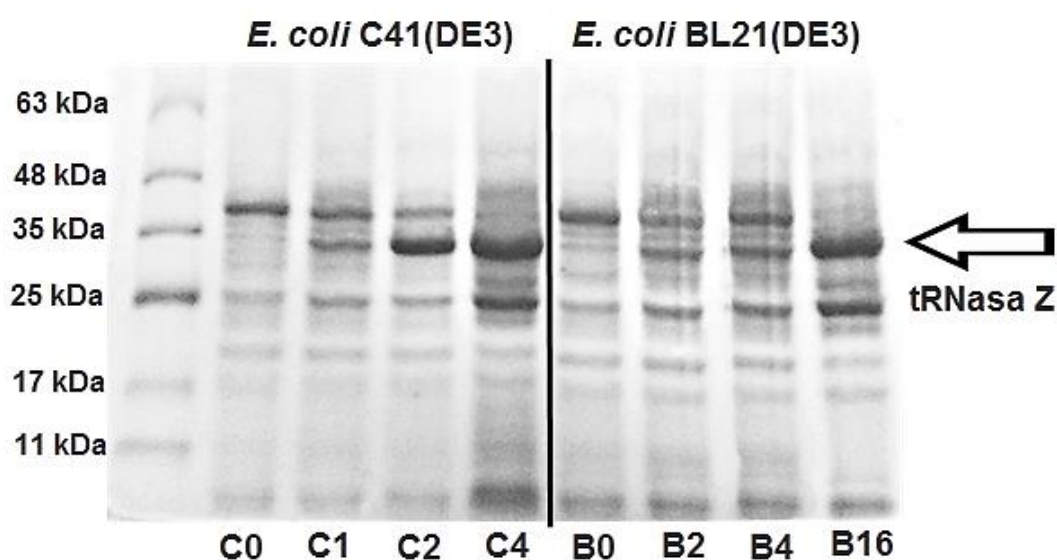


Figura 6.8 Comparación de condiciones de inducción.

MP) Marcador de peso. C1-C4) Inducción con *E. coli*C41 (DE3) a las 0.1 2 y 4 hrs.
B1-B16) Inducción con *E. coli* BL21 (DE3) a las 0. 2. 4 y 16 hrs.

5.2.2 Cromatografía de afinidad

El primer paso de la purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad, utilizando una columna His-Trap® FF. Al analizar la eficiencia de la cromatografía mediante electroforesis (Figura 6.9), es posible observar que el extracto crudo posee una gran cantidad de tRNasa Z, la cual se une a la columna cromatográfica mediante la interacción de la secuencia His-tag con los iones de níquel inmovilizados en la membrana de la misma, por lo que la fracción no retenida prácticamente no la contiene. Finalmente la proteína recombinante eluye de la columna al agregar Buffer de Elución ya que este posee una alta concentración de imidazol que compite por los iones de níquel.

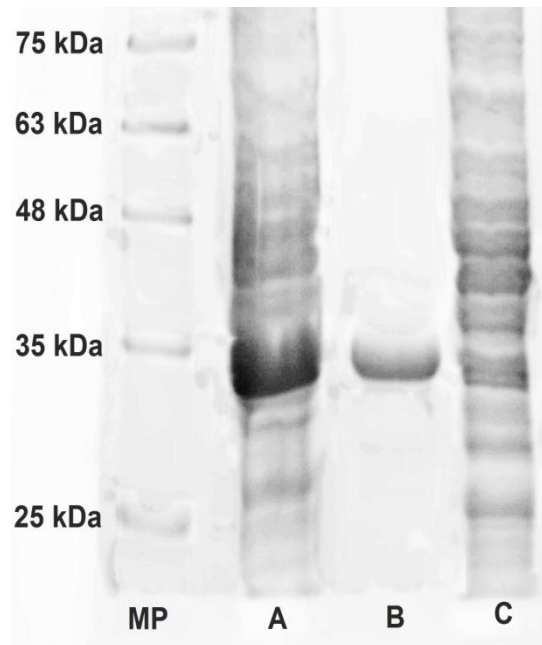


Figura 6.9 Cromatografía de afinidad

MP) Marcador de peso, A) Extracto crudo. B) Proteína eluída. C) Fracción no retenida.

5.2.3 Digestión con proteasa TEV

Tanto la proteína recombinante como un péptido control se trataron con la proteasa TEV, evaluando diferentes condiciones de reacción, como se indica en la Sección 4.2.3. Al término del período de incubación las muestras se purificaron utilizando cromatografía de afinidad y las fracciones inicial, retenida y no retenida

se analizaron mediante electroforesis. A pesar de las variadas condiciones utilizadas, no fue posible realizar satisfactoriamente la digestión de la proteína recombinante. La Figura 5.10 muestra un ejemplo de digestión utilizando amortiguador NaCl 250 mM, Tris-HCl 250 mM pH 8 e incubación a 25 °C durante dos horas, observándose que la eficiencia de la digestión de la tRNasa Z es prácticamente nula, mientras el péptido control es digerido en su totalidad.

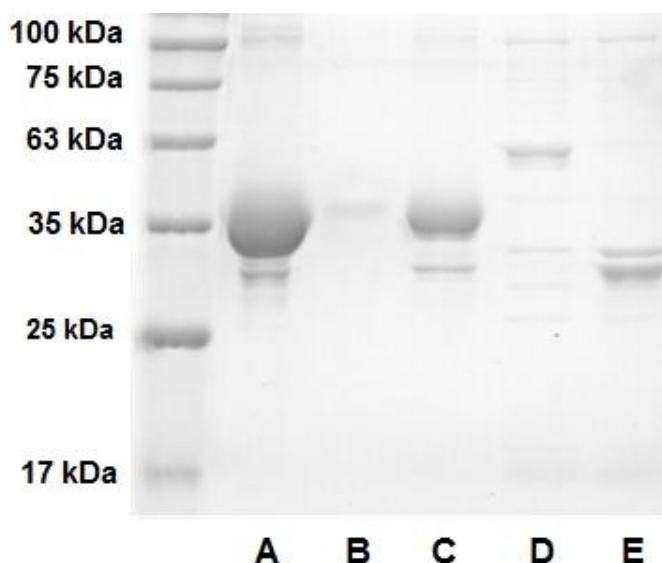


Figura 6.10 Digestión de tRNasa con proteasa TEV.

MP) Marcador de peso. A) tRNasa + TEV. B) tRNasa digerida. C) tRNasa sin digerir D) Péptido control + TEV. E) Péptido control digerido. TEV \approx 27kDa.

La ineficiencia en la digestión de la tRNasa Z puede indicar un impedimento estérico importante en el sitio de reconocimiento para la proteasa TEV dentro de la estructura de la proteína recombinante, en comparación con el péptido control que posee un sitio de reconocimiento de fácil acceso y es digerido prácticamente en su totalidad. Dado que la eficiencia de corte fue prácticamente nula se decidió trabajar con la tRNasa Z como una proteína de fusión, es decir con las secuencias de aminoácidos correspondientes al His-tag y el sitio de reconocimiento para TEV en el extremo N-terminal. Esta decisión se soporta con el hecho de que se ha reportado [28] que la presencia de dichas secuencias no provocan cambios

considerables en la estructura de la proteína ni en la estequiometría y coordinación de los iones de zinc en el sitio activo.

5.2.4 Cromatografía de intercambio iónico.

Debido a que al analizar la muestra purificada mediante cromatografía de afinidad es posible observar ciertas bandas además de aquella que corresponde a la tRNasa Z (Figura 6.9), se decidió llevar a cabo una cromatografía de intercambio iónico con el fin de obtener una muestra de mayor pureza. Para ello se utilizó un equipo de HPLC acoplado a un detector UV y una columna HiTrap Q HP, la muestra de tRNasa Z se inyectó en la columna y se eluyó utilizando un gradiente positivo de NaCl, generando el siguiente cromatograma:

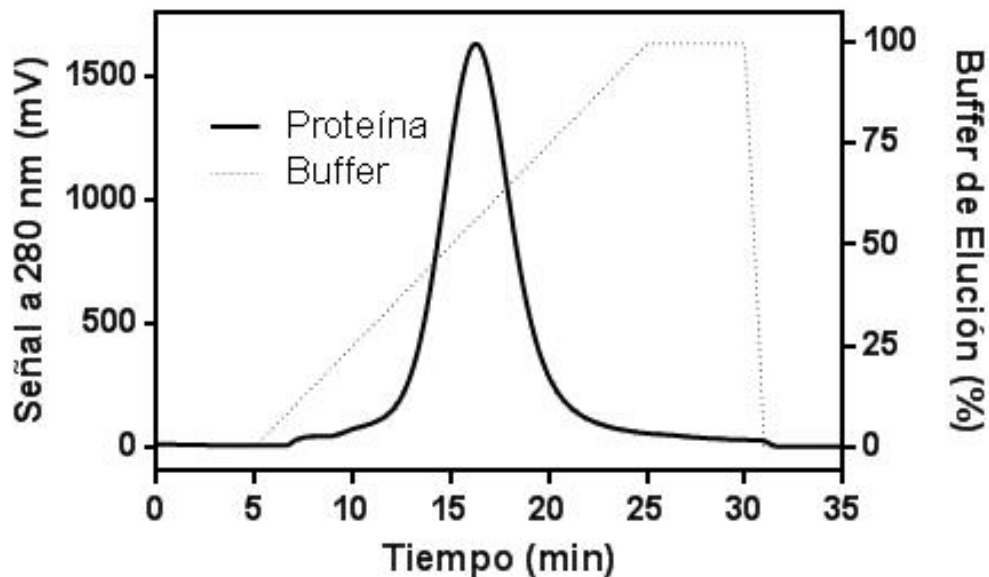


Figura 6.11 Cromatografía de intercambio iónico.

Se indica la señal correspondiente a la proteína eluída (línea sólida) y el porcentaje de Buffer de Intercambio en función del tiempo (línea punteada).

Al analizar las fracciones obtenidas a 7, 13, 16 y 21 minutos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Figura 6.12), se observa que a 7 minutos (Inicio del gradiente de concentración), se tiene la elución de ciertas proteínas contaminantes, mientras que al llegar a los 13 minutos (Inicio del pico) comienza la elución de la proteína recombinante aunque es posible observar aun ciertas bandas debajo de los 35 kDa, a los 16 minutos (Punto máximo del pico) solamente se observa a la tRNasa y, por último, a los 21 minutos (Final del pico) la tRNasa Z continua eluyendo de manera única, aunque en una cantidad considerablemente menor.

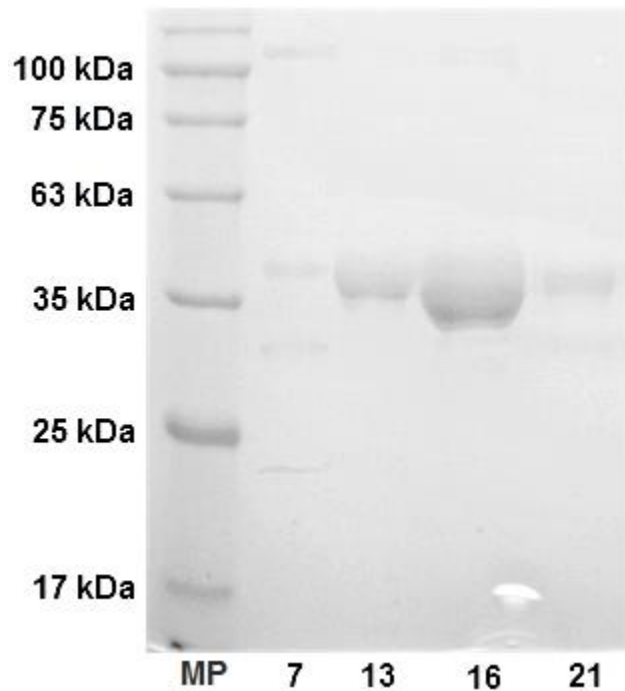


Figura 6.12 Análisis de fracciones de la cromatografía de intercambio iónico
MP) Marcador de peso.7), 13), 16) y 21) Fracciones seleccionadas.

Se decidió mezclar las fracciones obtenidas entre 13 y 21 minutos, ya que fueron aquellas que contenían a la tRNasa Z en mayor cantidad y pureza, posteriormente se intercambió el buffer de la muestras por Buffer de Ensayo para caracterización cinética.

La Figura 6.13 muestra el panorama general de purificación de la tRNasa Z, en el cual es posible observar la sobreexpresión de la proteína recombinante (A), su purificación mediante cromatografía de afinidad (B) y, finalmente, su purificación mediante cromatografía de intercambio iónico (C), obteniendo una muestra de alta pureza adecuada para la caracterización cinética.

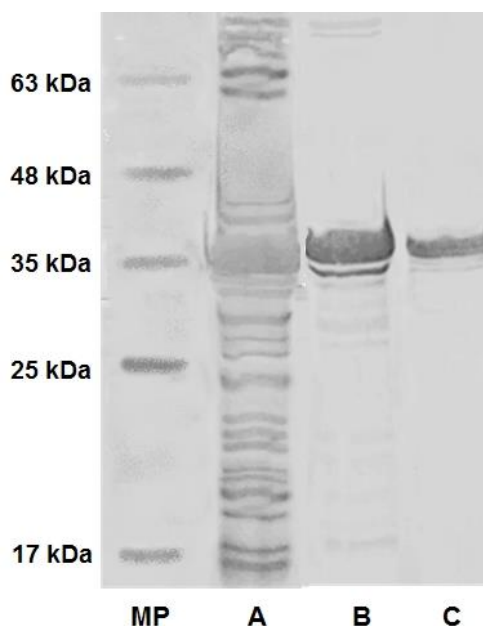


Figura 6.13 Panorama general de la purificación de la tRNasa Z de *E. coli*
MP) Marcador de peso, A) Extracto crudo. B) Cromatografía de afinidad.
C) Cromatografía de intercambio iónico.

6.3 Caracterización cinética

6.3.1 Actividad nativa

El estudio de la actividad nativa (fosfodiesterasa) de la tRNasa Z sobre el sustrato bis- ρ -nitrofenilfosfato (bpNPP) se llevó a cabo mediante ensayos espectrofotométricos continuos, monitoreando la formación de ρ -nitrofenol en Buffer de Ensayo (Tris-HCl 200 mM pH 7.4) a 25°C.

Los espectros de absorción del sustrato (bpNPP) y producto (ρ -nitrofenol), obtenidos a una concentración 100 nM (Figura 6.14), muestran que los máximos de absorción de dichos compuestos no se sobrelapan considerablemente, por lo que pueden ser detectados de manera independiente.

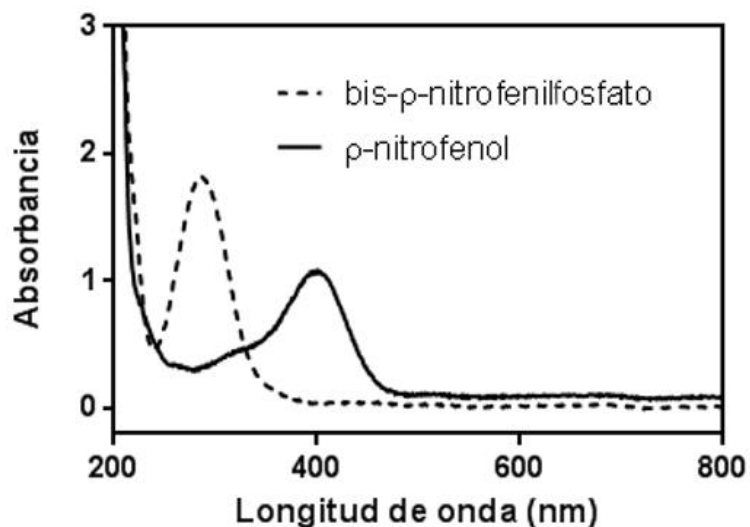


Figura 6.14 Espectro del sustrato (bis- ρ -nitrofenilfosfato) y producto (ρ -nitrofenol) para el estudio de la actividad nativa en Buffer de Ensayo.

Para obtener el coeficiente de absorptividad molar a 400 nm ($\epsilon_{400\text{nm}}$) del ρ -nitrofenol se obtuvo el espectro de absorción de soluciones a varias concentraciones del compuesto, en un rango de 300-500 nm (Figura 6.15).

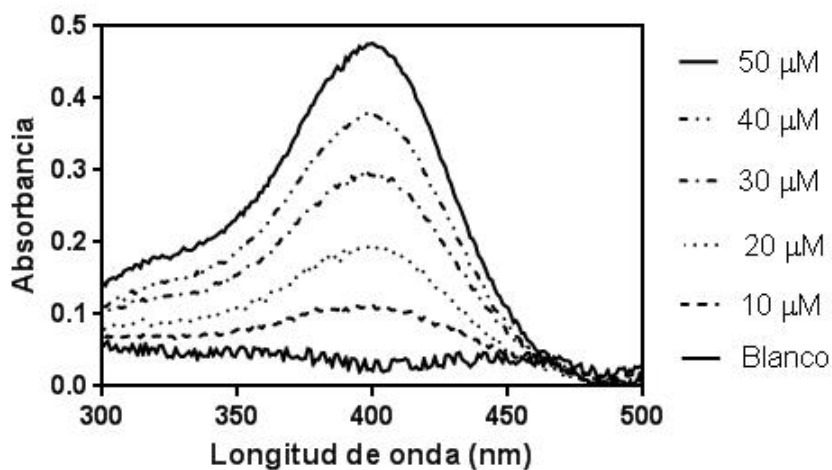


Figura 6.15 Espectros de ρ -nitrofenol a diferentes concentraciones.

El valor de $\epsilon_{400\text{nm}}$ se determinó a partir de la pendiente de la gráfica de absorbancia_{400nm} en función de la concentración de ρ -nitrofenol a 400 nm (Figura 6.16).

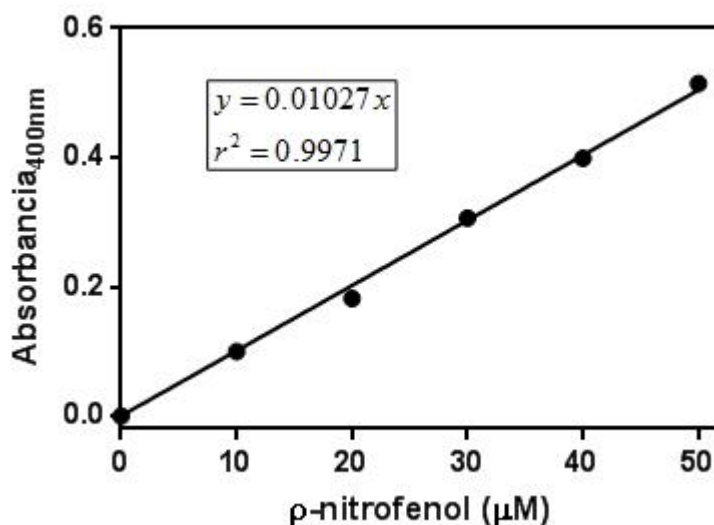


Figura 6.16 Curva patrón de ρ -nitrofenol a 400 nm.

Debido a que las soluciones utilizadas para la curva patrón se encuentran en el rango de concentración μM , es necesario convertir el valor de la pendiente (0.01027) a las unidades correspondientes al coeficiente de absortividad molar, como se indica en la siguiente ecuación:

$$\epsilon_{400\text{nm}} = 0.01027 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \frac{1 \times 10^6 \text{M}^{-1}}{\mu\text{M}^{-1}} = 10270 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

Ecuación 6.1 Cálculo del coeficiente de absortividad molar a 400 nm.

Por lo que el coeficiente de absortividad molar del ρ -nitrofenol a 400 nm y pH 7.4 es de $10270 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Se realizaron tres ensayos cinéticos a una concentración 2 mM de bpNPP y diferentes concentraciones de enzima para analizar la dependencia de la velocidad inicial respecto a la cantidad de enzima agregada así como la estabilidad de la enzima durante el curso de reacción.

Al graficar la velocidad inicial en función de la cantidad de enzima agregada (Figura 6.17) se observa que ésta presenta una dependencia lineal, es decir, a mayor cantidad de enzima mayor velocidad inicial. Indicando que la tRNasa Z posee actividad de fosfodiesterasa.

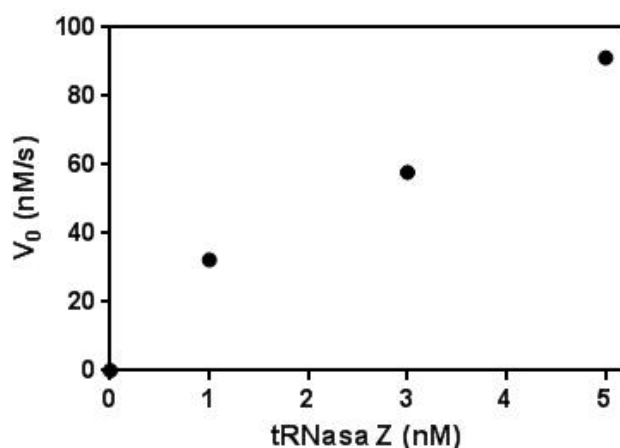


Figura 6.17 Velocidad inicial en función de la concentración de enzima.

La presencia de un punto isobéptico a 309 nm (Figura 6.18) confirma que durante el transcurso de la reacción enzimática existen dos especies: un sustrato (bpNPP) que disminuye su concentración, provocando una disminución en la absorbancia a 285 nm, y un producto (pNPP), que aumenta su concentración, provocando un aumento en la absorbancia a 400 nm; ambos fenómenos provocados por la actividad del tRNasa Z.

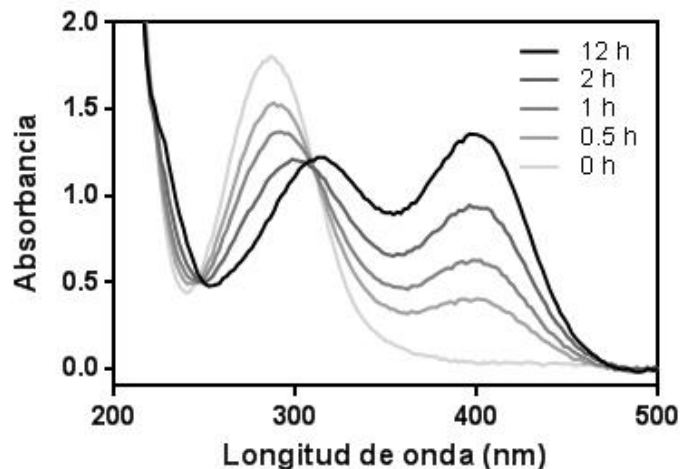


Figura 6.18 Punto isobéptico para la actividad nativa.

Esto puede apreciarse con mayor claridad al graficar, solamente, el cambio de absorbancia en los máximos de absorción del sustrato y el producto en función del tiempo (Figura 6.19).

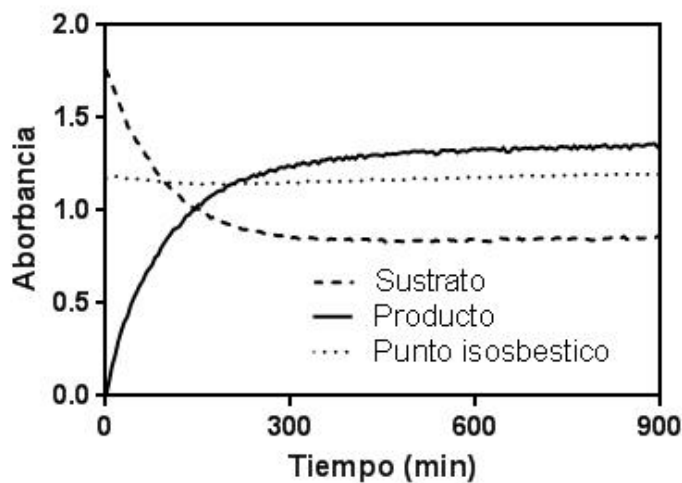


Figura 6.19 Curso de reacción para la actividad nativa.

Para determinar los parámetros cinéticos asociados a la actividad nativa se efectuaron, por triplicado, diversos ensayos a una concentración 3 nM de enzima y diferentes concentraciones de sustrato (bpNPP) como se indica en la Tabla 5.10. La Figura 6.20 muestra ejemplos de los cursos de reacción para cada concentración de sustrato utilizada, es posible apreciar cualitativamente el aumento de la velocidad inicial (pendiente) en función del aumento en la concentración de sustrato.

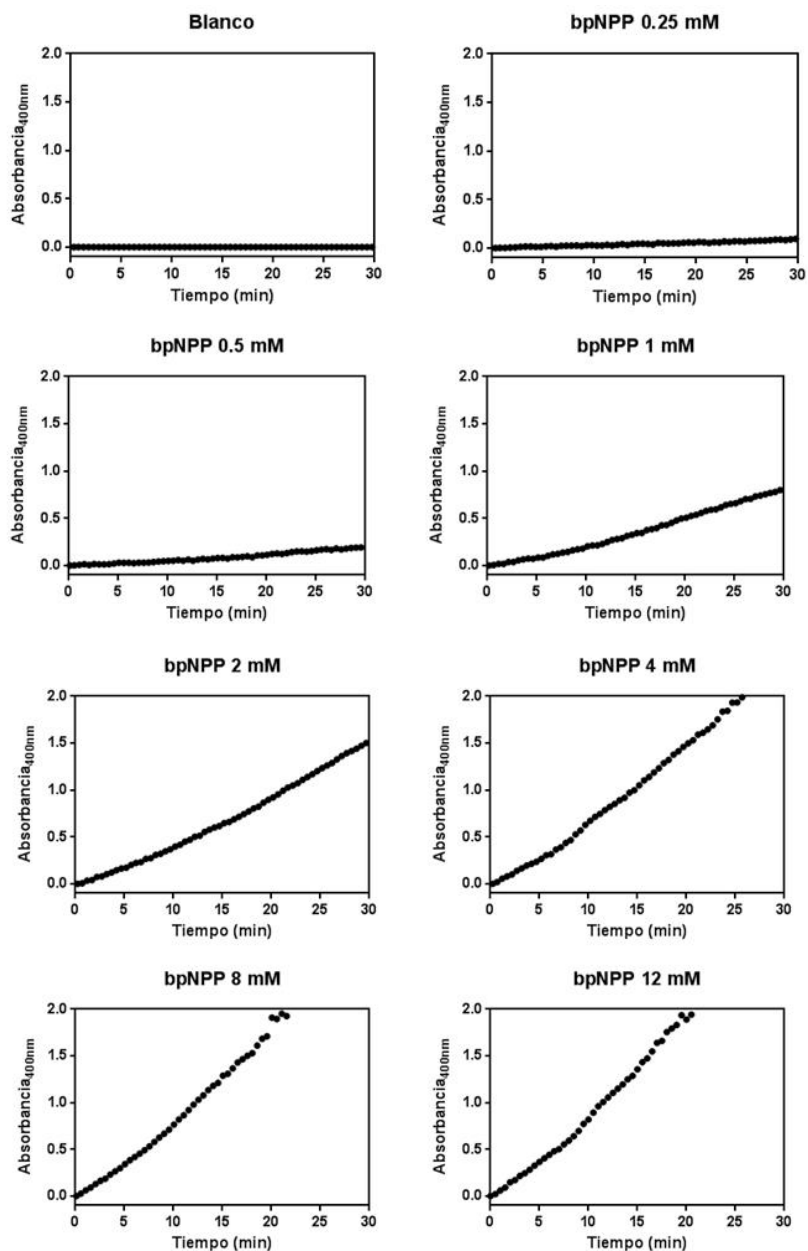


Figura 6.20 Cursos de reacción para la actividad nativa a diferentes concentraciones de sustrato.

La velocidad inicial de cada reacción se calculó a través de la Ecuación 3.1, como se indicó previamente. Los valores de velocidad inicial obtenidos se analizaron mediante el programa Graphpad Prism® versión 6.01 (Graphpad Software) comparando la calidad del ajuste al modelo de Michaelis-Menten y al modelo de de Hill (Allosteric Sigmoidal, según el programa). Los resultados del análisis se muestran a continuación:

Tabla 6.2 Parámetros de ajuste para la actividad nativa.

Parámetro	Alosterismo sigmoidal	Michaelis-Menten
Valores de ajuste		
Vmax	180.4	244.4
Km	-	5.213
<i>h</i>	1.563	-
K _{half}	2.741	-
K _{prime} (K _{half} ^{<i>h</i>})	4.834	-
Error estándar		
Vmax	7.807	15.99
Km	-	0.766
<i>h</i>	0.1369	-
K _{half}	0.2356	-
K _{prime}	0.4681	-
Intervalos al 95% de confianza		
Vmax	164.2–196.6	211.2–277.5
Km	-	3.624–6.802
<i>h</i>	1.278 - 1.847	-
K _{half}	2.251 - 3.231	-
K _{prime}	3.861 - 5.808	-
Calidad del ajuste		
Grados de libertad	21	22
R ²	0.9898	0.9780
Suma de cuadrados	990.7	2125
Sy.x	6.868	9.828
Prueba de falla de ajuste (Réplica)		
SD replica	7.107	7.107
SD falla de ajuste	6.042	14.81
Discrepancia (F)	0.7228	4.345
P	0.6160	0.0087
¿Evidencia de modelo inadecuado?	No	Si

Tabla 6.3 Evaluación de ajustes para la actividad nativa.

Hipótesis nula	Michaelis-Menten
Hipótesis alternativa	Alosterismo sigmoidal
P	0.0001
Conclusión ($\alpha = 0.05$)	Rechazar hipótesis nula
Modelo de ajuste	Alosterismo sigmoidal
F (DFn, DFd)	24.04 (1,21)

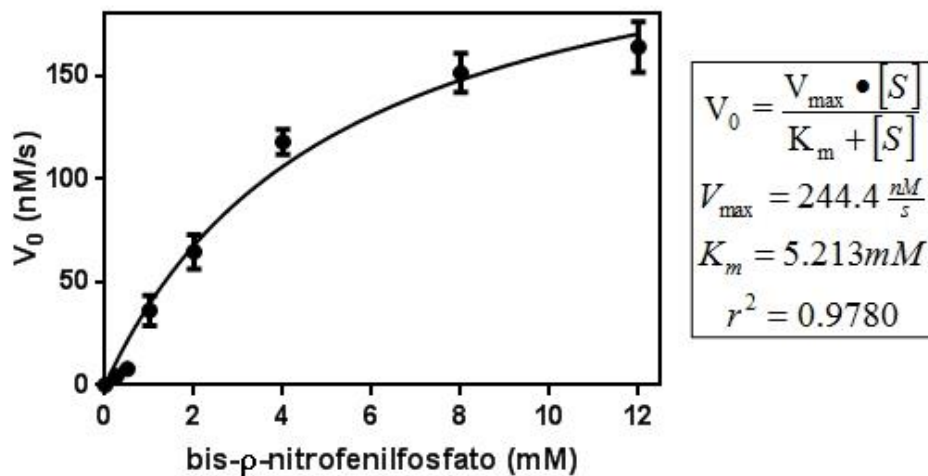


Figura 6.21 Ajuste de la cinética de la actividad nativa mediante la ecuación de Michaelis-Menten.

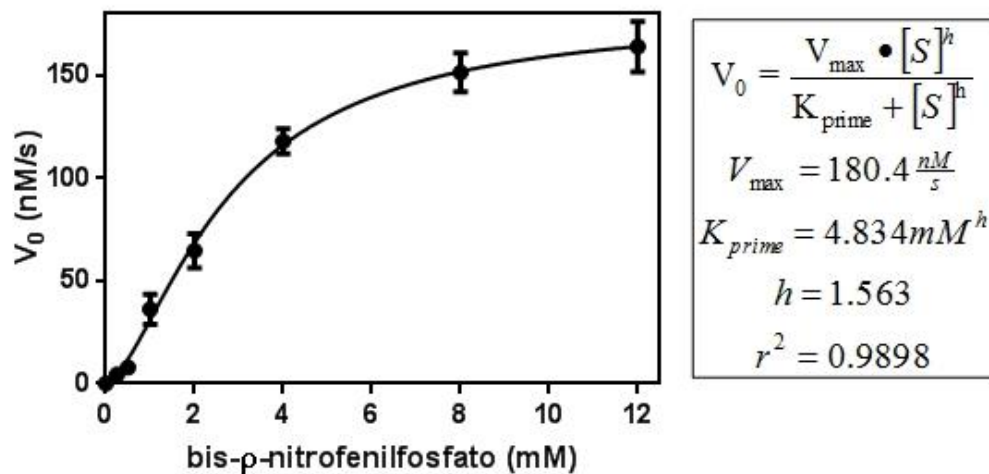


Figura 6.22 Ajuste de la cinética de la actividad nativa mediante la ecuación de Hill

La curva correspondiente a la actividad nativa (fosfodiesterasa) de la tRNasa Z sobre el bpNPP muestra un comportamiento sigmoideal acorde a la ecuación de Hill, en lugar del comportamiento hiperbólico característico del modelo de Michaelis Menten.

La curva sigmoideal indica cooperatividad positiva con un coeficiente de Hill $h=1.563$, valor consistente con una enzima homodimérica con dos sitios activos (el

valor debe ser mayor a 1 y cercano a 2). Los datos indican que la unión de la primera molécula de sustrato provoca cambios conformacionales o de distribución de carga que provocan un aumento en la afinidad de la tRNasa por la segunda de sustrato.

6.3.2 Actividad promiscua

El estudio de las actividades promiscuas de monofosfatasa y sulfatasa de la tRNasa Z sobre los sustratos p -nitrofenilfosfato (pNPP) y p -nitrofenilsulfato (pNPS) se llevó a cabo mediante ensayos espectrofotométricos continuos, monitoreando la formación de p -nitrofenol en Buffer de Ensayo (Tris-HCl 200 mM pH 7.4) a 25°C.

Los espectros de absorción de los sustratos (pNPP y pNPS) y el producto (p -nitrofenol), obtenidos a una concentración 100 nM (Figuras 6.23 y 6.24), muestran que los máximos de absorción de los sustratos no se sobrelapan considerablemente con el máximo de absorción del producto, por lo que pueden ser detectados de manera independiente.

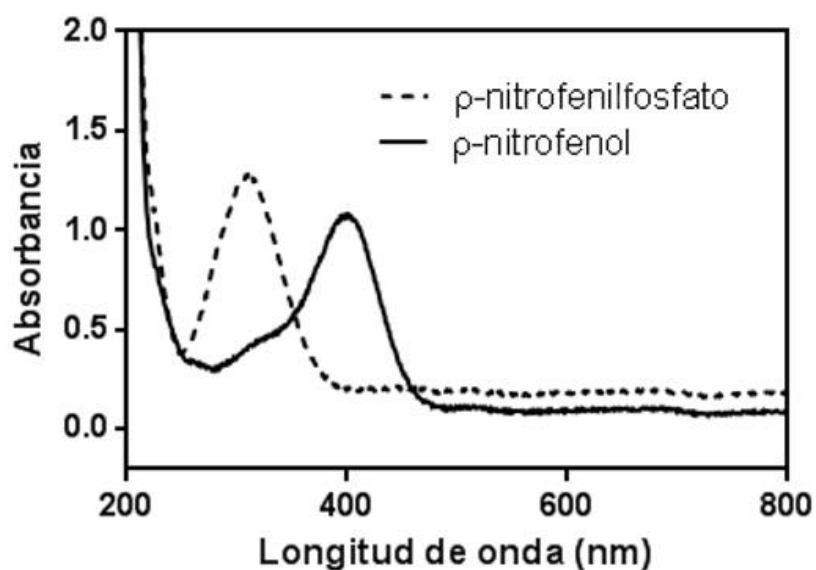


Figura 6.23 Espectro del sustrato (p -nitrofenilfosfato) y producto (p -nitrofenol) para el estudio de la actividad promiscua monofosfatasa.

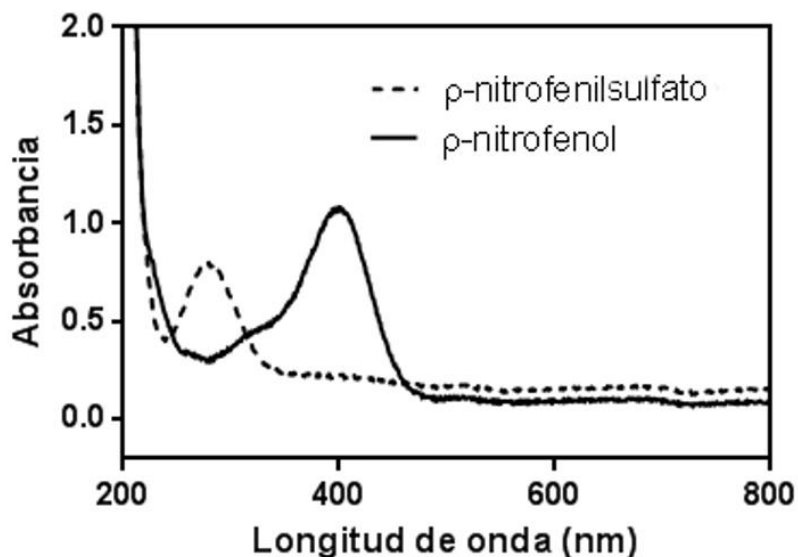


Figura 6.24 Espectro del sustrato (p -nitrofenil sulfato) y producto (p -nitrofenol) para el estudio de la actividad promiscua sulfatasa.

Debido a que a altas concentraciones de los sustratos comerciales empleados contienen un pequeño porcentaje de p -nitrofenol libre, cuando se trabaja a altas concentraciones de ellos, la absorbancia inicial a la longitud de onda de máxima absorción del producto es muy alta. Por tal motivo, se decidió monitorear los ensayos cinéticos a 410 nm, para lo cual se calculó el coeficiente de absortividad molar a dicha longitud de onda (ϵ_{410nm}), utilizando los datos de la curva patrón descrita en la sección 5.3.1.

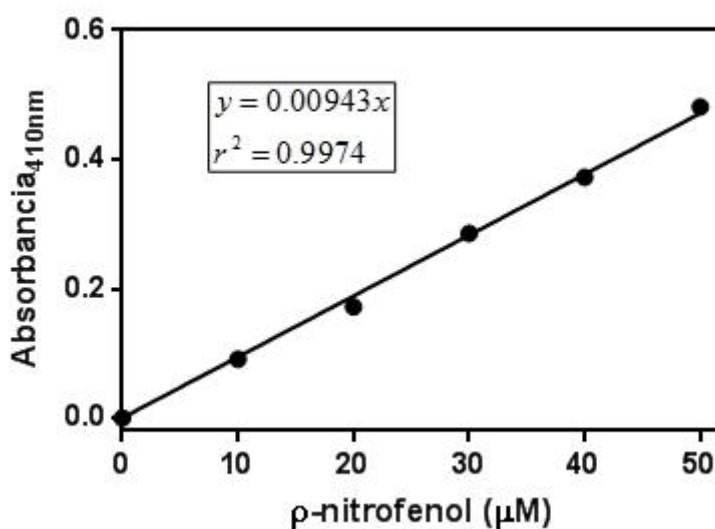


Figura 6.25 Curva patrón de p -nitrofenol a 410 nm.

Ya que las soluciones utilizadas se encuentran en el rango de concentración μM , es necesario convertir el valor de la pendiente (0.01027) a las unidades correspondientes al coeficiente de absortividad molar, como se indica en la ecuación:

$$\varepsilon_{410nm} = 0.00943 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} \frac{1 \times 10^6 \text{M}^{-1}}{\mu\text{M}^{-1}} = 9430 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Ecuación 6.2 Cálculo del coeficiente de absortividad molar a 410 nm.

Por lo que el coeficiente de absortividad molar a 410 nm y pH 7.4 del p-nitrofenol es de $9430 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los datos de absorbancia a 410 nm se analizaron de manera análoga a aquellos obtenidos a 400 nm para la actividad nativa.

Se realizaron tres ensayos cinéticos para cada sustrato (pNPP y pNPS) a una concentración 20 mM y diferentes concentraciones de enzima para analizar la dependencia de la velocidad inicial respecto a la cantidad de enzima agregada así como la estabilidad de la enzima durante el curso de reacción.

Al graficar la velocidad inicial en función de la concentración de enzima, se observa que únicamente las reacciones con pNPP (Figura 6.26) mostraron una dependencia lineal de la velocidad inicial respecto a la concentración de enzima, mientras las reacciones con pNPS (Figura 6.27) no son concluyentes ya que, aunque se observa cierta actividad, la velocidad inicial no aumenta linealmente; lo cual puede indicar que la tRNasa Z solamente posee actividad promiscua de monofosfatasa.

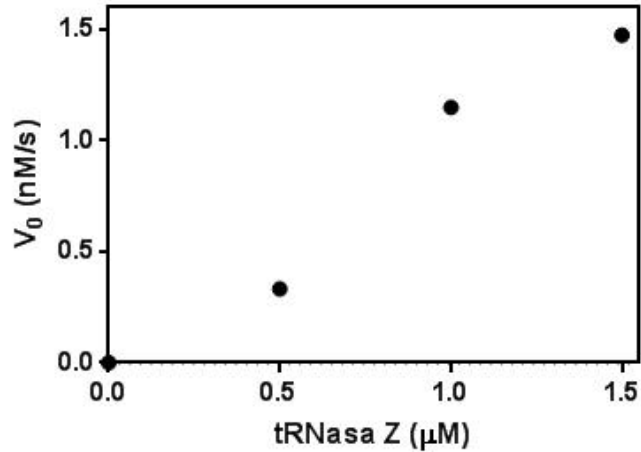


Figura 6.26 Dependencia de la velocidad inicial respecto a la concentración de enzima (actividad promiscua monofosfatasa).

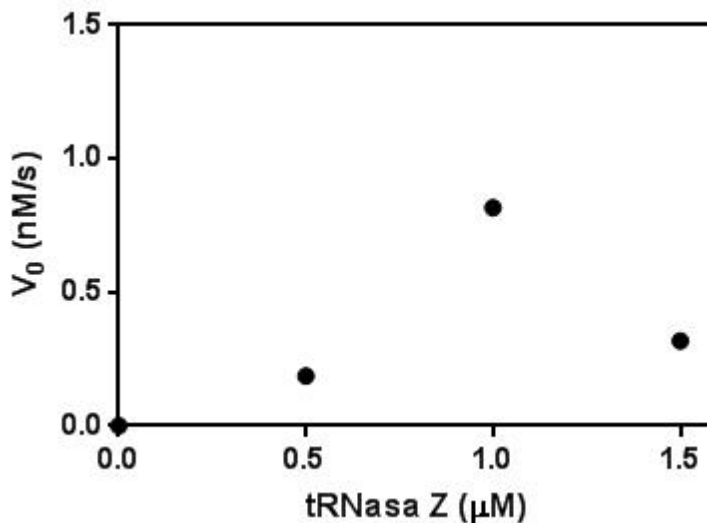


Figura 6.27 Dependencia de la velocidad inicial respecto a la concentración de enzima (actividad promiscua sulfatasa).

Para determinar los parámetros cinéticos asociados a la actividad promiscua fosfatasa se efectuaron, por triplicado, diversos ensayos a una concentración 1.2 μM de enzima y diferentes concentraciones de sustrato (pNPP) como se indica en la Tabla 5.12. La Figura 6.28 muestra ejemplos de los cursos de reacción para cada concentración de sustrato utilizada. Es posible apreciar cualitativamente el aumento de la pendiente (velocidad) en función de la concentración de sustrato.

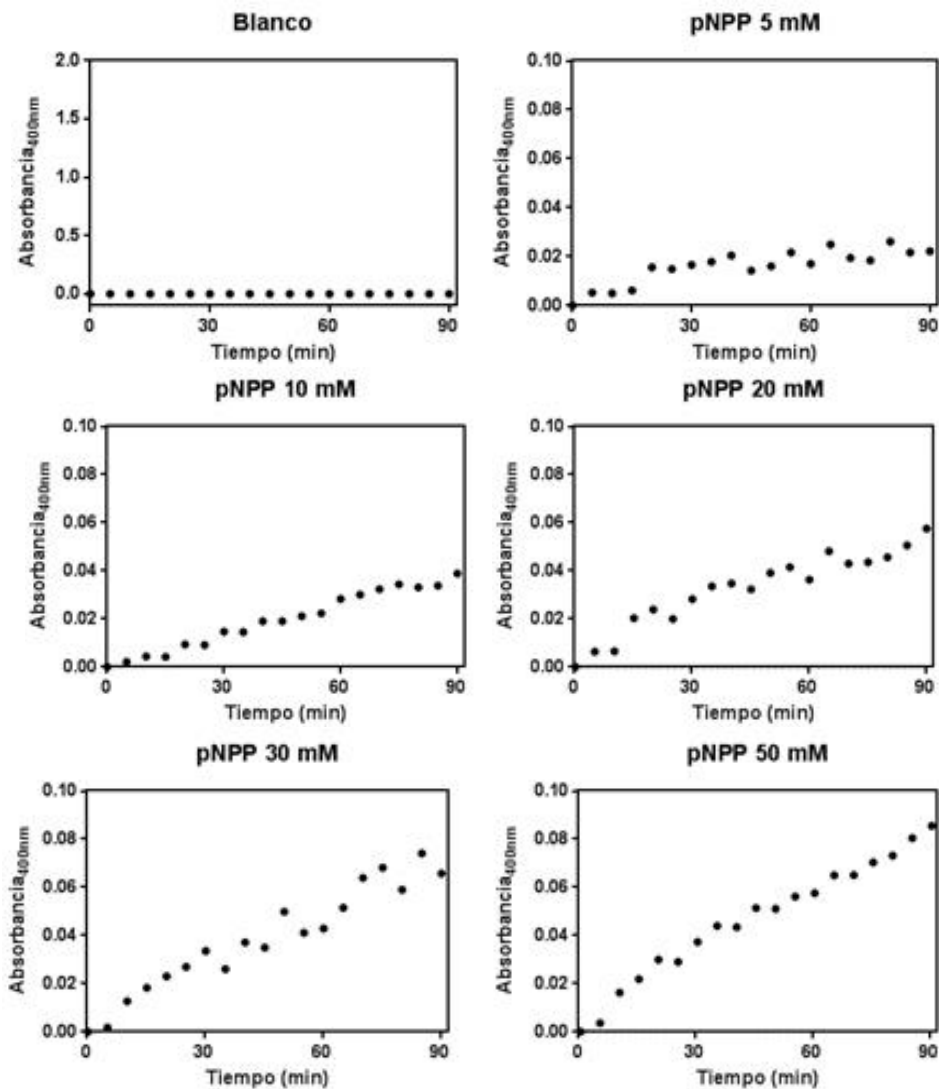


Figura 6.28 Cursos de reacción para la actividad promiscua (monofosfatasa) a diferentes concentraciones de sustrato.

La velocidad inicial de cada reacción se calculó utilizando la Ecuación 5.1, como se indicó previamente. Los valores de velocidad inicial obtenidos se analizaron mediante el software Graphpad Prism® versión 6.01 (Graphpad Software comparando la calidad del ajuste al modelo de Michaelis-Menten y al modelo de Alosterosmos Sigmoidal (ecuación de Hill). Los resultados del análisis se muestran a continuación:

Tabla 6.4 Parámetros de ajuste para la actividad promiscua (monofosfatasa).

Parámetro	Alosterismo sigmoidal	Michaelis-Menten
Valores de ajuste		
Vmax	3.294	2.433
Km	-	23.11
<i>h</i>	0.7974	-
K _{half}	47.18	-
K _{prime} (K _{half} ^{<i>h</i>})	21.61	-
Error estándar		
Vmax	1.483	0.1743
Km	-	3.523
<i>h</i>	0.1949	-
K _{half}	51.82	-
K _{prime}	4.873	-
Intervalos al 95% de confianza		
Vmax	0.1343 – 6.453	2.063 – 2.802
Km	-	15.43 – 30.79
<i>h</i>	0.3821 – 1.213	-
K _{half}	0.0 – 157.6	-
K _{prime}	11.22 – 31.99	-
Calidad del ajuste		
Grados de libertad	15	16
R ²	0.9776	0.9759
Suma de cuadrados	0.1288	0.1386
Sy.x	0.09268	0.09308
Prueba de falla de ajuste (Replica)		
SD replica	0.07745	0.7745
SD falla de ajuste	0.1377	0.1291
Discrepancia (F)	3.160	2.778
P	0.0642	0.0761
¿Evidencia de modelo inadecuado?	Si	No

Tabla 6.5 Evaluación de ajustes para la actividad promiscua (monofosfatasa).

Hipótesis nula	Michaelis-Menten
Hipótesis alternativa	Alosterismo sigmoidal
P	0.3026
Conclusión ($\alpha = 0.05$)	No rechazar hipótesis nula
Modelo de ajuste	Michaelis-Menten
F (DFn, DFd)	1.40 (1,15)

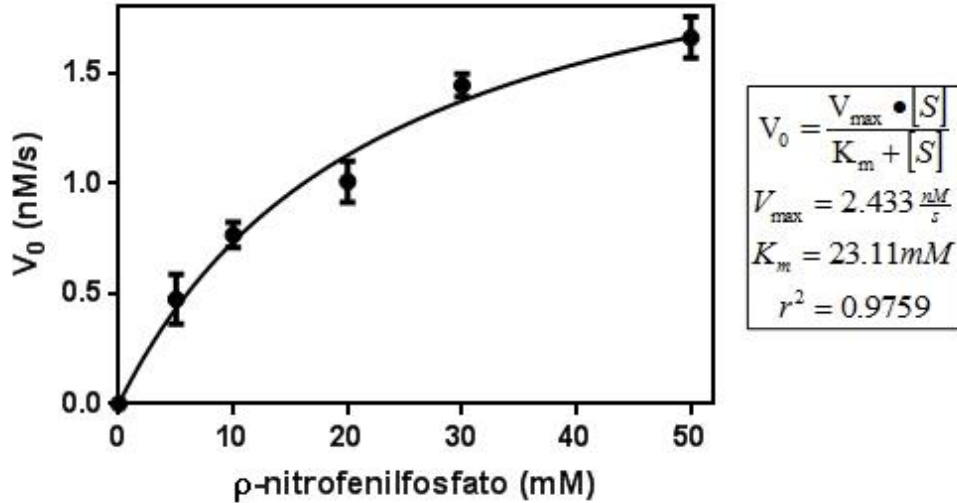


Figura 6.29 Ajuste de la cinética de la actividad promiscua monofosfatasa mediante la ecuación de Michaelis-Menten

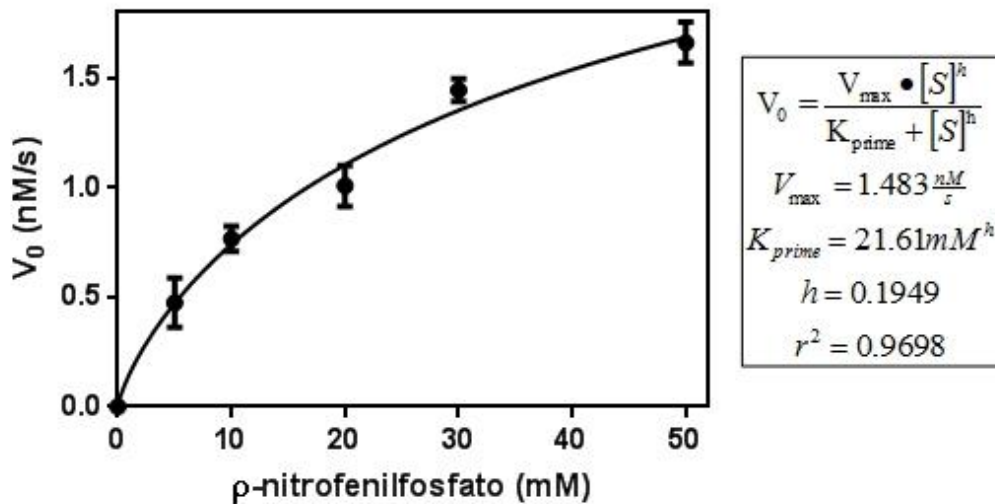


Figura 6.30 Ajuste de la cinética de la actividad promiscua monofosfatasa mediante la ecuación de Hill

La curva con el mejor ajuste muestra un comportamiento hiperbólico acorde al modelo de Michaelis-Menten, en lugar del comportamiento sigmoidal (ecuación de Hill) observado para la actividad nativa fosfodiesterasa. Los resultados indican que la tRNasa Z de *E. coli* solo es capaz de procesar una sola molécula de pNPP a la vez. El hecho de que el sitio catalítico de la tRNasa Z sea capaz de procesar un sustrato con una carga negativa adicional llevando a cabo la hidrólisis de un

enlace monoéster en lugar de uno de los enlaces en un diéster demuestra la gran plasticidad catalítica que brinda la conformación tridimensional común de las metalo- β -lactamasas.

Los valores de K_m para el sustrato nativo bpNPP y el sustrato promiscuo pNPP, confirman que la tRNasa Z posee una mayor afinidad por su sustrato nativo, sin embargo, la afinidad de dicha enzima por el sustrato promiscuo pNPP es considerablemente alta, incluso mayor que la afinidad de ciertas enzimas por su sustrato nativo (catalasa, quimotripsina, β -galactosidasa, etc.).

Aunque la constante catalítica (k_{cat}) de la tRNasa Z para el sustrato promiscuo es varios órdenes de magnitud menor a la del sustrato nativo, ésta logra una tasa de aceleración (k_{cat}/k_{uncat}) respecto a la reacción sin catalizar considerablemente alta, en el rango de la actividad nativa de ciertas enzimas, aunque bastante menor a la alcanzada para la reacción nativa de la tRNasa Z.

Como es de esperarse, los valores de eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m), capacidad catalítica ($(k_{cat}/K_m)/k_{uncat}$) y de la constante de segundo orden para la hidrólisis no enzimática en agua ($(k_{cat}/K_m)/k_w$) de la reacción nativa respecto a la reacción promiscua, confirman que la tRNasa Z muestra una clara preferencia por el sustrato nativo y que ha evolucionado para llevar a cabo la hidrólisis de fosfodiésteres, sin embargo, también es capaz de llevar a cabo la hidrólisis de ésteres de fosfato con un desempeño similar al de ciertas enzimas en sus reacciones nativas.

Tabla 6.6 Aumento de la velocidad en la reacción nativa y promiscua

	Actividad nativa fosfodiesterasa	Actividad promiscua monofosfatasa
K_m (mM)	4.834	23.11
k_{cat} (s^{-1})	60.13	2×10^{-3}
k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	1.24×10^4	8.65×10^{-2}
k_{cat}/k_{uncat}	4.63×10^{12}	7.41×10^5
$(k_{cat}/K_m)/k_{uncat}$ (M^{-1})	1.13×10^{15}	3.20×10^7
$(k_{cat}/K_m)/k_w$	6.22×10^{16}	1.76×10^9

El trabajo realizado brinda un panorama general de la capacidad catalítica de la tRNasa Z sobre su sustrato nativo y sus posibles actividades promiscuas. El hecho de que la enzima sea capaz de actuar sobre sustratos modelo diferentes a los fosfodiésteres que conforman su sustrato nativo apoya la noción que indica que esta enzima posee funciones fisiológicas adicionales a la maduración de los pre-tRNA. Estudios cinéticos con otros posibles sustratos promiscuos, mutaciones puntuales que afecten tanto el sitio catalítico como otros elementos estructurales clave de la enzima e intercambios entre los iones metálicos coordinados en el sitio activo aparecen como buenas perspectivas de trabajo para continuar el estudio de una enzima de tal interés como la tRNasa Z de *E. coli*.

7. Conclusiones

- Las mejores condiciones de sobreexpresión para la tRNasa Z se obtienen al utilizar la cepa C41(D3), IPTG 1 mM e incubación a 30° C durante 4 horas.
- La cinética de la actividad nativa de la tRNasa Z sobre el bpNPP se ajusta al modelo de cooperatividad (ecuación de Hill) con una $k_{\text{cat}} = 60.13\text{s}^{-1}$, $K' = 4.83\text{mM}$ y un coeficiente de Hill $h = 1.56$, logrando acelerar la hidrólisis del bpNPP 4.63×10^{12} veces respecto a la reacción sin catalizar.
- La cinética de la actividad promiscua de monofosfatasa de la tRNasa Z sobre el pNPP se ajusta al modelo de Michaelis-Menten con una $k_{\text{cat}} = 2 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ y $K_m = 23.11\text{mM}$, logrando acelerar la hidrólisis del pNPP 7.41×10^5 veces respecto a la reacción sin catalizar.
- Durante los experimentos no fue posible detectar actividad promiscua de sulfatasa.

8. Bibliografía

1. Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 48, 1-13.
2. Ceballos, M., Vioque, A. (2007). tRNase Z. *Protein & Peptide Letters*, 14, 137-145.
3. Chandrasekhar, V., Krishnan, V., Azhakar, R. (2005). Biocatalysis by metallated cyclotriphosphazenes: $L_2Zn(NO_3)_2$ {L = spiro-N3P3[O₂C₁₂H₈][N(CH₃)NH₂]} as a synthetic phosphoesterase and nuclease. *Journal Of Chemical Sciences*, 117, 175-178.
4. Chen, W., Kuo, T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acid Research*, 21, 2260.
5. Copley, S. D. (2003). Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Current Opinions in Chemical Biology*, 7, 265-272.
6. de la Sierra-Gallay, I. L., Pellegrini, O., Condon, C. (2005). Structural basis for substrate binding, cleavage and allostery in the tRNA maturase RNase Z. *Nature*, 403, 657-661.
7. Dominski, Z. (2007). Nucleases of the Metallo- β -lactamase Family and Their Role in DNA and RNA Metabolism. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42, 67-93.
8. Dutta, T., Deutscher, M. P. (2010). Mode of Action of RNase BN/RNase Z on tRNA Precursors. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 22874-22881.
9. Garber, R., Gage, P. (1979). Transcription of *Bombyx mori* tRNA^{2Ala} gene: nucleotide sequence of the tRNA precursor and its processing in vitro. 18, 817-828.

10. Hartmann, R. K., et al (2009). The making of tRNAs and more - RNase P and tRNase Z. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 85, 319-368.
11. Hult, K., Berglund, P. (2007). Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends in Biotechnology*, 25, 231-238.
12. Jensen, R. A. (1976). Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annual Review on Microbiology*, 30, 409-425.
13. Johnson, B. H., Hecht, M. H. (1994) Recombinant Proteins Can Be Isolated from *E. coli* Cells by Repeated Cycles of Freezing and Thawing. *Bio/Technology*, 12, 1357-1360.
14. Kapust, R., et al (2002). The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 949-955.
15. Khersonsky, O., Tawfik, D. S. (2010). Enzyme Promiscuity – Evolutionary and Mechanistic Aspects. In Mander, L., Lui, H. (Eds.), *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* (pp. 48-90). Elsevier: Oxford.
16. Khersonsky, O., Tawfik, D. S. (2010). Enzyme Promiscuity: A Mechanistic and Evolutionary Perspective. *Annual Reviews in Biochemistry*, 79, 471-505.
17. Khersonsky, O., Roodveldt, C., Tawfik, D. S. (2006). Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 498–508.
18. Kostecky, B., et al (2006). The Crystal Structure of the Zinc Phosphodiesterase from *Escherichia coli* Provides Insight into Function and Cooperativity of tRNase Z-Family Proteins. *Journal of Bacteriology*, 188, 1807-1614.
19. Marangoni, A. G. (2003). *Enzyme Kinetics: A modern Approach* (1 ed.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
20. O'Brien, P. J., Herschlag, D. (1999). Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chemistry & Biology*, 6, R91-R105.
21. Olguin, L. F., et al (2008). Efficient Catalytic Promiscuity in an Enzyme Superfamily: An Arylsulfatase Shows a Rate Acceleration of 10^{13} for Phosphate Monoester Hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 16547-16555.
22. Redko, J., de la Sierra-Gallay, I. L., Condon, C. (2007). When all's zed and done: the structure and function of RNase Z in procaryotes. 5, 278-286.

23. Sambrook, J., Rusell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3 ed., Vol. 1, págs. 1.112-1.115) Protocol 24: The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*: "Ultra-Competent" Cells. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
24. Tavtigian, V. S, *et al.* (2003). A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nucleic Acids Research*, 31, 2272-2278.
25. Todd, A. E., Orengo, C. A., Thornton, J. M. (2001). Evolution of Function in Protein Superfamilies, from a Structural Perspective. *Journal of Molecular Biology*, 307, 1113-1143.
26. Tolia, N. H., Joshua-Tor, L. (2006). Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nature Methods*, 3, 55-64.
27. Torres, I. I., *et al.* (2012). Promiscuous enantioselective (-)- γ -lactamase activity in the *Pseudomonas fluorescens* esterase I. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10, 3388-3392.
28. Vogel, A., *et al* (2002). ElaC Encodes a Novel Binuclear Zinc Phosphodiesterase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 29078-29085.
29. Vogel, A., *et al* (2005). The tRNase Z family of proteins: physiological functions, substrate specificity and structural properties. *Biological Chemistry*, 386, 12, 1253-1264.
30. Weaver, R. F. (2008). *Molecular Biology* (4 ed., págs. 625-628). McGraw-Hill.

9. Anexos

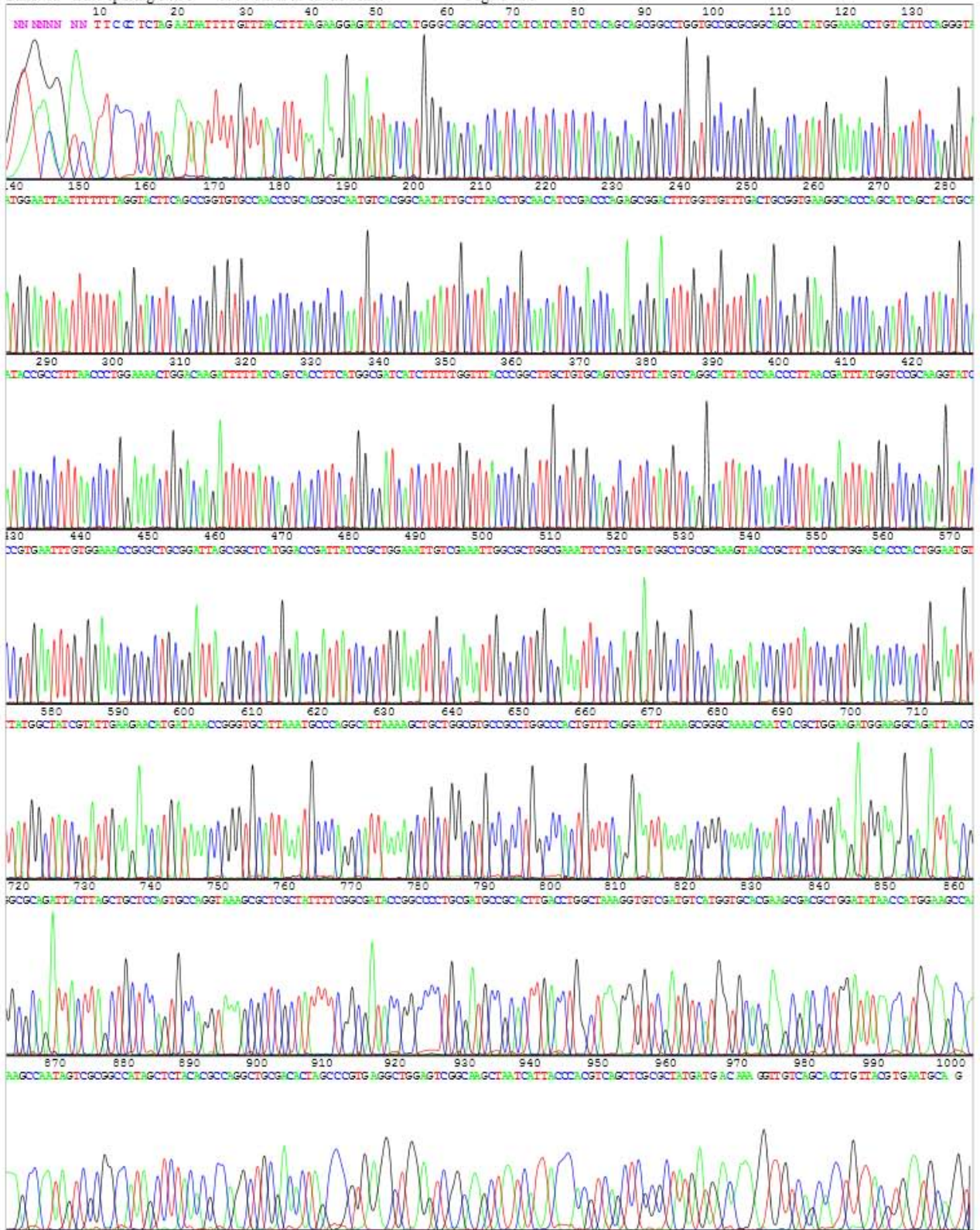


Figura 9.1 Secuencia del plásmido recombinante a partir del Promotor T7.

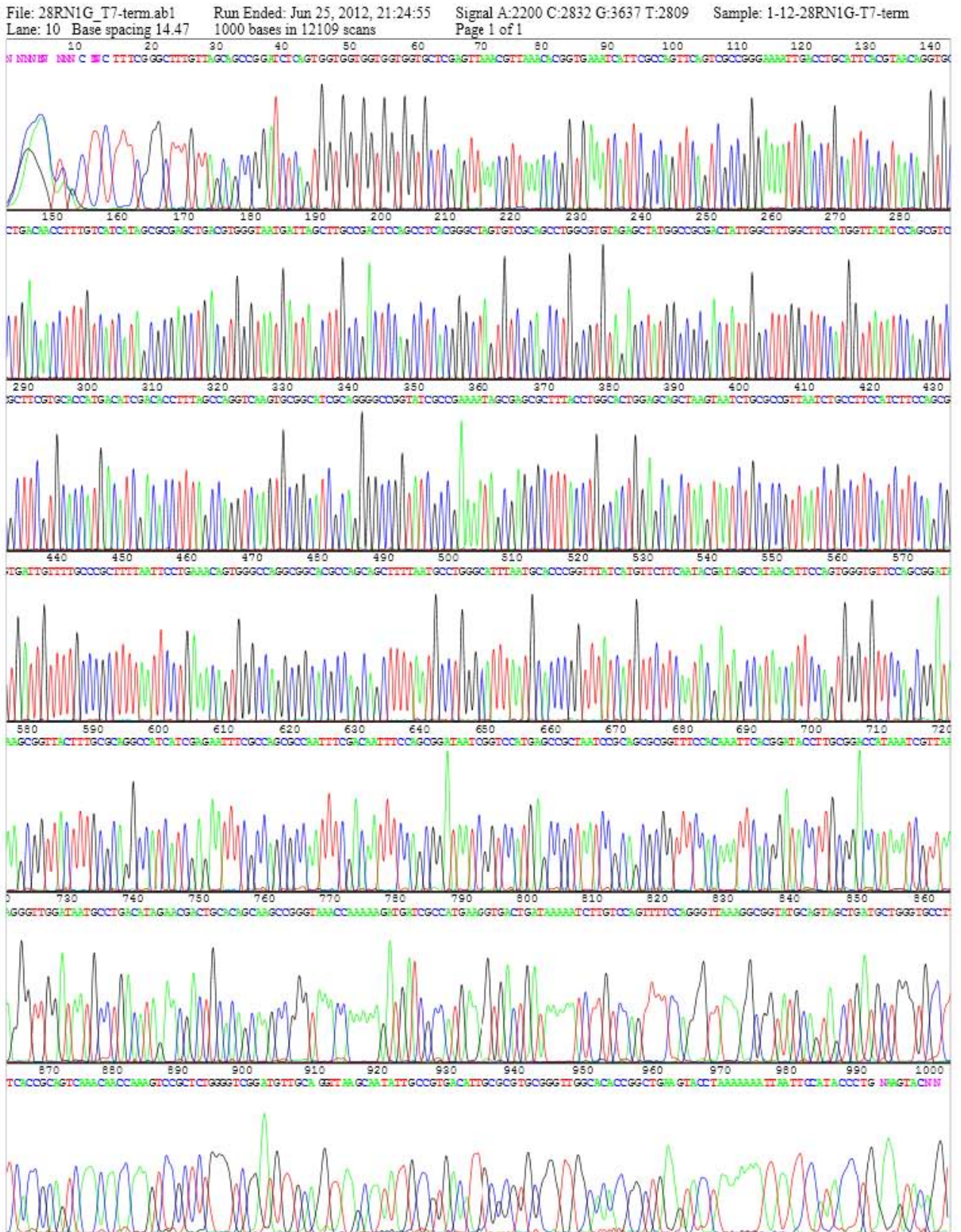
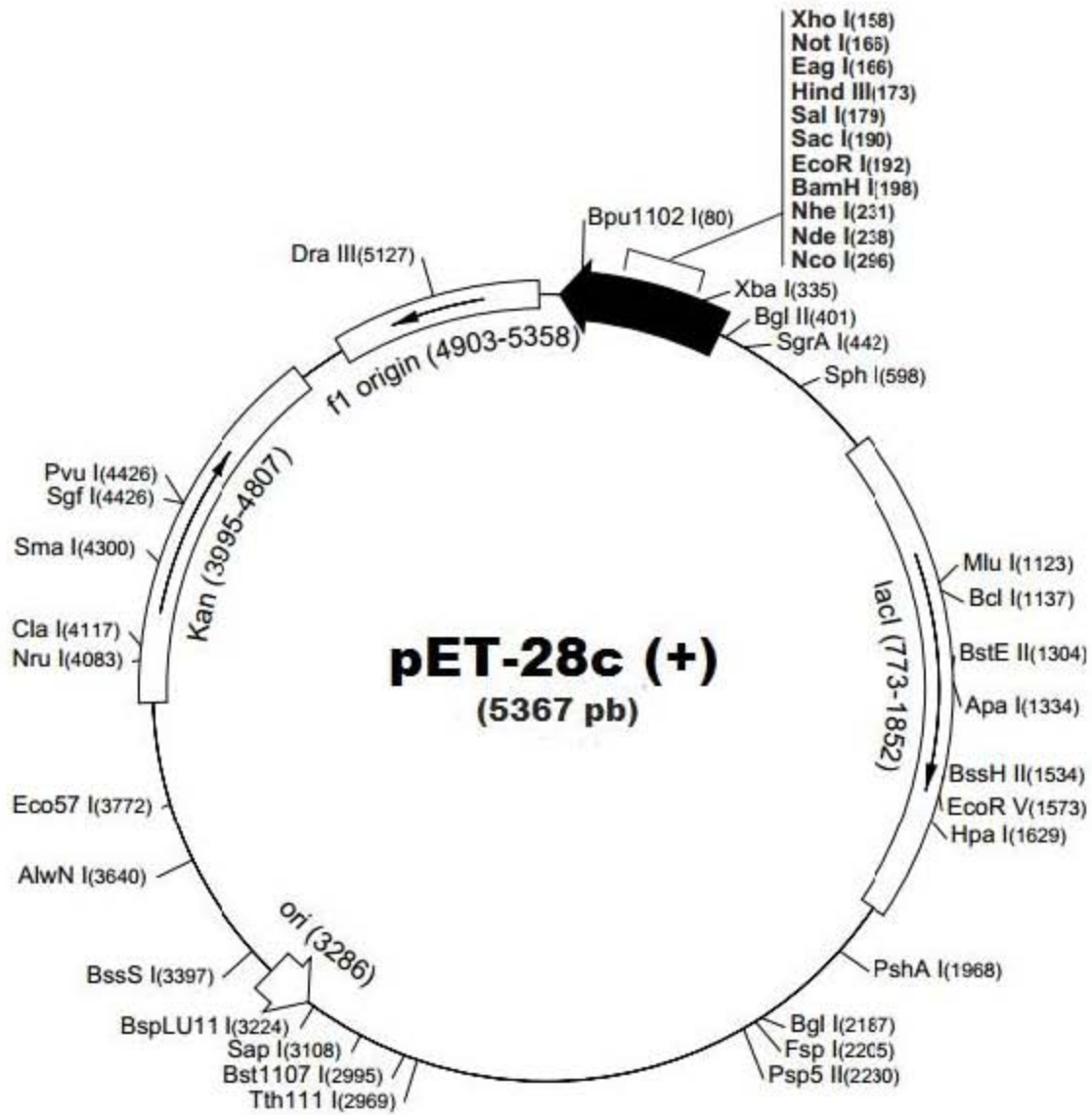


Figura 9.2 Secuencia del plásmido recombinante a partir del Terminador T7.



pET-28a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> I I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

Figura 9.3 Mapa del plásmido pET-28c.