

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



CAMBIO DE ESPECIFICIDAD POR DINUCLEOTIDO DE LA 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA DE *Escherichia coli*

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización en Bioquímica de Proteínas y Biotecnología y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

Eduardo Andrés Tobar Calfucoy

Directores de Tesis:

Dr. Ricardo Cabrera Paucar

Dr. Carlos Santiviago Cid

Santiago-CHILE

ENERO 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato:

Eduardo Andrés Tobar Calfucoy

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica de Proteínas y Biotecnología y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día 28 de Enero del 2016.

Directores de Tesis:

Dr. Ricardo Cabrera

Dr. Carlos A. Santiviago

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez

Dr. Mauricio Báez

Dra. Oriana Salazar

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Ricardo, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi tesis en su laboratorio. Por su apoyo como tutor y por la formación que me ha brindado. Le agradezco también las oportunidades que me ha ofrecido en este tiempo.

Al Dr. Carlos Santiviago, por su permanente apoyo, consejo y disposición en la realización de mi tesis. Por permitirme realizar parte de mi trabajo de tesis bajo su supervisión.

Comisión evaluadora, Dra. Oriana Salazar, Dr. Sergio Álvarez y Dr. Mauricio Baez, por compromiso, dedicación y tiempo para la revisión permanente de este trabajo.

Al Dr. Ulrich Schwaneberg por recibirme en su laboratorio, a Dr. Ronny Martinez y Dr. Felix Jacob por guiarme y apoyarme durante mi estadía en Alemania. A Catalina Novoa y todas las personas que me ayudaron en Aachen.

A los que son y fueron compañeros del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, a Matu, Matias, Dady, Yessenia, Coto, Erick, Matsuda, niño Juan Carlitos, Dixon, Feñita, Jebus, Alonso, Coté, Gabo, Mora, Ale, Felipe, Víctor, Exe, Pablo, Danae, a la señora Nieves, entre tantos. A la gente del laboratorio de Microbiología: Raet, Pipe, Roberto, Ceci, Paula, Seba y en especial Andrea y Camu.

A mis amigos y compañeros de carrera por compartir buenos y difíciles momentos de nuestra carrera que culminan con la tesis.

A mis amigos del colegio por siempre creer en mí, por celebrarme cada logro.

A mi familia; mis abuelos, mi Tia Marcia y Diego, mis sobrinos, mis hermanos Miguel y Jacqueline. A mis padres Juan Ricardo y Flora.

Por ayudarme en los días buenos y en especial los malos. El mejor equipo que podría tener. Gracias Fabiola.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias y en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, ambas de la Universidad de Chile. El trabajo fue financiado por los proyectos FONDECYT 1121170 y FONDECYT 1140754. Además, para la realización del programa de estudios se contó con el financiamiento de CONICYT PCHA/Beca Magíster en Chile 221320362 y con la Beca para estadías cortas en el extranjero del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iii
FINANCIAMIENTO.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN	2
1. Rol de NAD(H) y NADP(H).....	2
2. Transferencia de equivalentes de reducción entre NAD(H) y NADP(H).....	5
3. Efecto del NADPH sobre el crecimiento	5
4. Familia de enzimas 6-fosfogluconato deshidrogenasa	7
5. Diseño racional	12
6. Evolución dirigida	12
6.1. Elaboración de un sistema de <i>screening</i>	14
6.2. Enriquecimiento de cultivo	14
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	16
1. OBJETIVO GENERAL.....	16
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIALES.....	17
1. REACTIVOS.....	17
2. CEPAS BACTERIANAS	18
3. PLÁSMIDOS.....	18
4. PARTIDORES UTILIZADOS.....	22
5. MEDIOS DE CULTIVO	23

MÉTODOS.....	25
1. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS.....	25
2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	27
2.1. Preparación de ADN cromosomal.....	27
2.2. Preparación de ADN plasmidial.....	28
2.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	28
2.4. Amplificación de genes mediante PCR.....	29
2.5. Digestión con enzimas de restricción.....	29
2.6. Purificación de ADN desde un gel de agarosa.....	30
2.7. Ligación vector-inserto	30
2.8. Test de inducción 6-fosfogluconato dehidrogenasa de <i>G. oxydans</i> y <i>E. coli</i>	30
2.9. Mutagénesis sitio-dirigida	31
2.10. Mutagénesis de saturación de sitios	33
3. MÉTODOS DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA	34
3.1. Transformación de cepas mediante electroporación.....	34
3.2. Deleción de elementos cromosomales	34
3.3. Deleciones de múltiples elementos cromosomales.....	38
4. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE <i>Ec6PGDH</i> NATIVA Y MUTANTES.....	39
4.1. Purificación de 6-fosfogluconato deshidrogenasa.....	39
4.2. Determinación de concentración de proteínas	40
4.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE).....	40
4.4. Determinación de la actividad enzimática de extracto.....	41
4.5. Determinación de velocidad inicial	41
4.6. Determinación de las constantes cinéticas aparentes.....	42
RESULTADOS.....	43
1. Análisis de residuos conservados en la familia 6PGDH.....	43
2. Diseño racional de la 6PGDH de <i>Escherichia coli</i>	46
2.1. Generación de variantes de <i>Ec6PGDH</i>	46
2.2. Caracterización cinética de variantes del motivo NRSX ₂ K de la <i>Ec6PGDH</i>	47

3. Generación de cepa inviable en glucosa	50
4. Evaluación del efecto del cambio de especificidad desde NADP a NAD de las variantes 6PGDH generadas en la cepa inviable en glucosa	52
4.1. Subclonamiento de variantes de genes de 6-fosfogluconato deshidrogenasa.....	52
4.2. Inducción de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa	54
4.3. Caracterización fisiológica: tasa de crecimiento	56
5. Desarrollo del sistema de selección.....	57
5.1. Estandarización del sistema de selección.....	57
5.2. Mutagénesis de saturación de sitios	62
DISCUSIÓN.....	64
1. Estudios de traza evolutiva	64
2. Efecto de las mutaciones en el motivo NRX ₃ K en <i>Ec6PGDH</i> en la preferencia por dinucleótido	64
3. Fenotipo de la cepa inviable en glucosa.....	65
4. Expresión con IPTG en el sistema pTrc99a	67
5. Sistema de selección.....	68
6. Generación de librería.....	69
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Coenzimas más utilizadas en reacciones catalíticas dentro del metabolismo de <i>Escherichia coli</i>	2
Figura 2. Representación estructural de NAD y NADP	3
Figura 3. Vías centrales del metabolismo de <i>E. coli</i>	4
Figura 4. Reacción de oxidación del 6-fosfogluconato y estructura de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>E. coli</i>	8
Figura 5. Árbol filogenético de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa	10
Figura 6. Vector de expresión pET-TEV.....	20
Figura 7. Vector de clonamiento pBluescript II.	21
Figura 8. Vector de expresión pTrc99	21
Figura 9. Diagrama de la metodología para el análisis de residuos conservados.	26
Figura 10. Análisis de residuos conservados en la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa	45
Figura 11. Secuenciación de las variantes de <i>Ec6PGDH</i>	46
Figura 12. Comportamiento cinético de las variantes DVKA y DVKN de <i>Ec6PGDH</i>	49
Figura 13. Verificación de cepas mutadas.	51
Figura 14. Subclonamiento de los genes <i>Ec6PGDH</i> ^{WT} , <i>Ec6PGDH</i> ^{DVKN} y <i>Go6PGDH</i>	53
Figura 15. Expresión de 6PGDH del plásmido pTrc99.....	55
Figura 16. Curva de crecimiento de las cepas Δ^4 WT, Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox.....	57
Figura 17. Enriquecimiento de cultivo en competencia	59
Figura 18. Efecto del cultivo en medio mínimo sobre la expresión de proteínas.....	61
Figura 19. Efecto de glucosa en la expresión de 6-fosfogluconato deshidrogenasa en medio LB	61
Figura 20. Secuenciación de clones generados mediante mutagénesis de saturación de sitios	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutantes construidas de <i>E. coli</i> y su máxima tasa de crecimiento durante cultivo en glucosa.	6
Tabla 2. Parámetros cinéticos de 6PGDH disponibles en el laboratorio.	11
Tabla 3. Frecuencia codogénica generada por los codones degenerados NNN y NNK.....	13
Tabla 4. Reactivos utilizados.	17
Tabla 5. Cepas bacterianas.	18
Tabla 6. Plásmidos utilizados en el presente estudio.	19
Tabla 7. Partidores utilizados en el siguiente estudio.	22
Tabla 8. Constantes cinéticas de las enzimas 6PGDH disponibles y generadas en el laboratorio.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

6PG	6-fosfogluconato
6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
dNTP	desoxinucleotido trifosfato
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
<i>Ec</i>6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Escherichia coli</i>
<i>Go</i>6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa de <i>Gluconobacter oxydans</i>
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
<i>k_{cat}</i>	Constante catalítica
K_M	Constante de Michaelis Menten
NAD	Dinucleótido de nicotinamida-adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido
NADP	Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato oxidado
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato reducido
NAD(P)	NAD y NADP
NAD(P)H	NADH y NADPH
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

TEMED

N,N,N',N'-tetrametilendiamina

X-gal

5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

En el metabolismo heterotrófico, NADH y NADPH se producen a partir de la oxidación de intermediarios por las deshidrogenasas presentes en las vías del metabolismo central. Durante el crecimiento de *Escherichia coli* en glucosa como única fuente de carbono, un tercio de la producción total del NADPH proviene de las deshidrogenasas de la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato: la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Diversos grupos han estudiado como se altera la fisiología de *E. coli* cuando se modifican las razones NADH/NAD y NADPH/NADP, encontrando que la sobreproducción de NADPH puede llevar a la inviabilidad celular cuando se utiliza glucosa como única fuente de carbono. Estudios para comprender la importancia del balance de cofactores han llevado a cambiar la especificidad de sustrato de estas enzimas, de modo que puedan usar NAD como cofactor en lugar de NADP. Este enfoque ha sido fructífero en el caso de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, pero no en el caso de 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Esta enzima cataliza la descarboxilación de 6-fosfogluconato para producir ribulosa 5-fosfato, usando NADP como cofactor con alta especificidad.

Una forma de estudiar este problema es investigando el efecto en el metabolismo, de forzar el flujo de glucosa hacia la vía de las pentosas fosfato. Bajo condiciones de crecimiento en glucosa, la sobreproducción de NADPH generaría una reducción significativa de la tasa de crecimiento de *E. coli*. La hipótesis de este trabajo es que el cambio de especificidad *in vivo* de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Escherichia coli* desde NADP a NAD, permite una recuperación parcial en la tasa de crecimiento en una cepa $\Delta pgi \Delta udhA$, incapaz de sobrevivir en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, debido a la alteración en la topología de las vías centrales del metabolismo. Para cambiar la especificidad por cofactor de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, en este trabajo, se implementaron metodologías de diseño racional y evolución dirigida para lograr la forma NAD específica.

Para identificar posiciones determinantes de la especificidad por NAD(P) se realizó un análisis de traza evolutiva de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Se encontró 3 *loops* que serían relevantes para la especificidad por NAD(P), incluyendo el motivo NRX₃K contenido en el *loop* β 2- α 2 del bolsillo de unión a dinucleótido en la enzima de *E. coli*. Desde este análisis, se generó mediante mutagénesis sitio dirigida la variante N33D-R34V-S35K-K38N. Debido a la presencia de estas mutaciones, la K_M para NAD disminuyó 5 veces mientras que no se observó actividad con NADP.

Se generó la cepa de *E. coli* Δ *pgi* Δ (*edd-eda*) Δ *udhA* Δ *gnd* mediante la eliminación del gen de fosfogluconosa isomerasa, el operón Entner-Doudoroff, de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y de la transhidrogenasa UdhA, que reoxida el NADPH. Esta cepa presentó una marcada disminución en la tasa de crecimiento debido al incremento en la producción de NADPH al desviar el flujo de glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato. Esta mutante se transformó con un plásmido que poseía la versión del gen de 6-fosfogluconato deshidrogenasa dependiente de NAD, encontrándose que la presencia de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa productora de NADH le permite a esta bacteria recuperar la capacidad de crecer en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono.

Para incrementar la especificidad de la enzima por NAD, se generó una librería por mutagénesis de saturación de sitios en 4 residuos dentro de los 3 *loops*. Además, se desarrolló un sistema de selección basado en la cepa de *E. coli* Δ *pgi* Δ (*edd-eda*) Δ *udhA* Δ *gnd*. Debido a las diferencias en las velocidades de crecimiento, se logró diseñar un sistema de selección basado en el enriquecimiento de cultivo, aislando aquellas cepas que estaban complementadas con 6-fosfogluconato deshidrogenasa productora de NAD. Sin embargo, al usar el protocolo propuesto se observó que los niveles de expresión de las variantes de enzimas varían considerablemente entre antes y después de someter la cepa a selección en medio mínimo, por lo que el protocolo debe ser optimizado para que el cepa

sea utilizada como sistema de selección para una librería de variantes 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

De este trabajo se concluye que el uso *in vivo* de una variante de 6-fosfogluconato deshidrogenasa con un cambio de especificidad de cofactor desde NADP a NAD, permite recuperar parcialmente el crecimiento en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono, probablemente debido a modificaciones en el balance de los cofactores NAD(P)H/NAD(P). Finalmente, la relación entre el crecimiento y la especificidad de las deshidrogenasas del metabolismo central puede ser utilizada como método de selección de variantes con especificidad de cofactor cambiada de NADP a NAD mediante evolución dirigida.

ABSTRACT

Change of the dinucleotide specificity of the 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Escherichia coli*

In the heterotrophic metabolism, NADH and NADPH are produced from the oxidation of intermediates by dehydrogenases present in central metabolism pathways. During the growth of *Escherichia coli* in glucose as sole carbon source, one third of the total NADPH production belongs to the oxidative branch of the pentose phosphate pathway: the glucose 6-phosphate dehydrogenase and the 6-phosphogluconate dehydrogenase. Several groups have been studying how the *E. coli* physiology is modified when NADH/NAD and NADPH/NADP are altered, finding that NADPH overproduction could lead to cell unviability when glucose is the sole carbon source. Studies to understand the importance of cofactor balance have led to change the substrate specificity of these enzymes, in order to use NAD as cofactor instead of NADP. This approach has been succeeding for glucose 6-phosphate dehydrogenase, but not for 6-phosphogluconate dehydrogenase. This enzyme catalyzes the decarboxylation of 6-phosphogluconate to produce ribulose 5-phosphate, using NADP as cofactor with high specificity.

One form of to study this problem is investigating the effect in the metabolism, due to force the glucose flux through the pentose phosphate pathway. Under glucose growth conditions, NADPH overproduction would generate a significant reduction in growth rate of *E. coli*. The hypothesis of this work is that the specificity change *in vivo* of the 6-phosphogluconate dehydrogenase from *E. coli*, from NADP to NAD, allows to restore partially the growth rate in a $\Delta pgi \Delta udhA$ strain, unable to grow in minimal media with glucose as sole carbon source, due to modifications in the topology of the central metabolism pathways. To change the cofactor specificity of the 6-phosphogluconate dehydrogenase, in this work, rational design and directed evolution methodologies were implemented to obtain the NAD-specific form.

To identify determinants positions of the NAD(P) specificity, evolutionary trace analysis to the 6-phosphogluconate dehydrogenase family was performed, finding 3 loops that could be relevant for NAD(P) specificity, including the β 2- α 2 loop containing the NRX₃K motif of the dinucleotide binding pocket of the *E. coli* enzyme. From this analysis, the variant N33D-R34V-S35K-K38N was generated by site-directed mutagenesis. Due the presence of these substitutions, the NAD K_M decreased 5-times and no activity was observed with NADP.

A *E. coli* Δ *pgi* Δ (*edd-eda*) Δ *udhA* Δ *gnd* strain was generated by deleting phosphoglucose isomerase gen, Entner-Doudoroff operon, 6-phosphogluconate dehydrogenase and UdhA transhydrogenase, which reoxidize NADPH. This strain shows a remarkable decreased growth rate due to NADPH production increment by forcing glucose flux through pentose phosphate pathway. This strain was transformed with a plasmid bearing a 6-phosphogluconate dehydrogenase gen variant NAD-dependent, finding that the presence of the NADH-producing 6-phosphogluconate dehydrogenase allows the bacteria to restore the capacity to grow in minimal media with glucose as sole carbon source.

In order to increase the NAD specificity, a clone library by site-saturation mutagenesis of 4 residues within the 3 loops was performed. In addition, a selection strategy based on the designed strain was developed. Since the growth rates differences, a selection system based on enrichment culture, isolating NAD-producing 6-phosphogluconates bearing strains. However, with the proposed protocol, enzymes variants expression levels vary between before and after strain culturing in minimal media, so the protocol must be optimized in order to use the strain as a selection system for a 6-phosphogluconate dehydrogenase library.

We conclude from this work that the usage *in vivo* of a 6-phosphogluconate dehydrogenase variant with a specific change from NADP to NAD, allows partially restore the growth rate of an unviable strains in glucose as sole carbon source, probably by modifications in the NAD(P)H/NAD(P) cofactors balance. Finally, the relation between growth rate and central metabolism dehydrogenase specificity can be used for biotechnological purposes, like a selection system for directed evolution.

INTRODUCCIÓN

Los organismos heterótrofos poseen diferentes vías metabólicas que les permiten oxidar distintas fuente de carbono. Dichas rutas cumplen principalmente dos funciones: generar precursores para la biosíntesis o anabolismo, y proveer la energía (como ATP, NADPH y la fuerza protón-motriz) que se requiere para el consumo de nutrientes, la biosíntesis y el crecimiento [Holms, 1986].

En el caso de *E. coli*, el metabolismo aeróbico se encuentra constituido por casi 1000 reacciones, pero el núcleo de éstas lo componen sólo 11 intermediarios de las vías centrales del metabolismo y los cofactores ATP/ADP, NADH/NAD y NADPH/NADP [Sauer y cols, 2004], como se muestra en la **Figura 1** [Orth y cols, 2011].

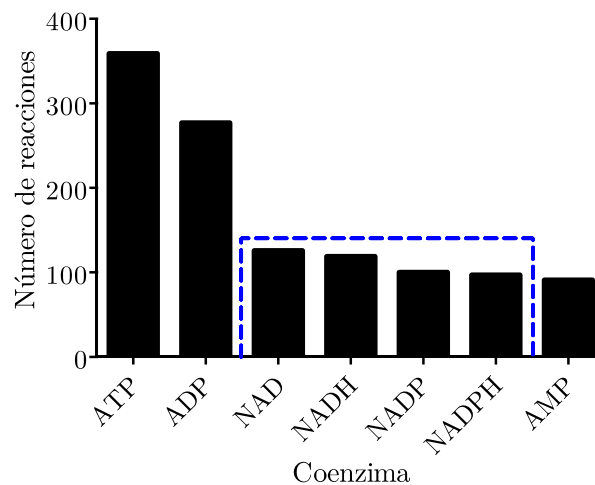


Figura 1. Coenzimas más utilizadas en reacciones catalíticas dentro del metabolismo de *Escherichia coli*. Las barras indican el número de reacciones en las que participan. El recuadro azul punteado representa los cofactores estudiados en este trabajo. Los datos fueron calculados a partir del modelo iJO1366 de *Escherichia coli*.

1. Rol de NAD(H) y NADP(H)

Las deshidrogenasas en las principales vías del metabolismo central son las enzimas productoras de cofactores reducidos [Fuhrer y Sauer, 2009]. En la glicólisis, el ciclo de

Krebs y la vía de las pentosas fosfato, la mayoría de las reacciones de oxido-reducción usan NAD y NADP como cofactores.

La estructura química de estos metabolitos muestra tres regiones en común: una región nicotinamida, una región adenina y una región difosfato [Nelson y Cox, 2006] (**Figura 2**). Sin embargo, estos cofactores difieren en dos aspectos principales. Estructuralmente, el NADP posee un grupo fosfato esterificado en la posición 2' de la ribosa perteneciente a la adenosina [Nelson y Cox, 2006] (**Figura 2**). Metabólicamente, los equivalentes reducidos NADH y NADPH poseen roles distintos. Mientras que los electrones del NADH son destinados a receptores que abandonan el sistema, como la fosforilación oxidativa y la fermentación, los electrones del NADPH son entregados a receptores que permanecen en el sistema, como en reacciones del estrés oxidativo y la generación de biomasa [Fuhrer y Sauer, 2006].

Estas diferencias en función metabólica son consecuencia de la especificidad por cofactor de las deshidrogenasas que participan en estos procesos. Esto se debe a que dichas enzimas poseen residuos que afectan positiva o negativamente la energía de interacción con el grupo fosfato 2', permitiendo discriminar entre NAD y NADP como cofactores para la oxidación de metabolitos [Carugo y Argos, I, 1997].

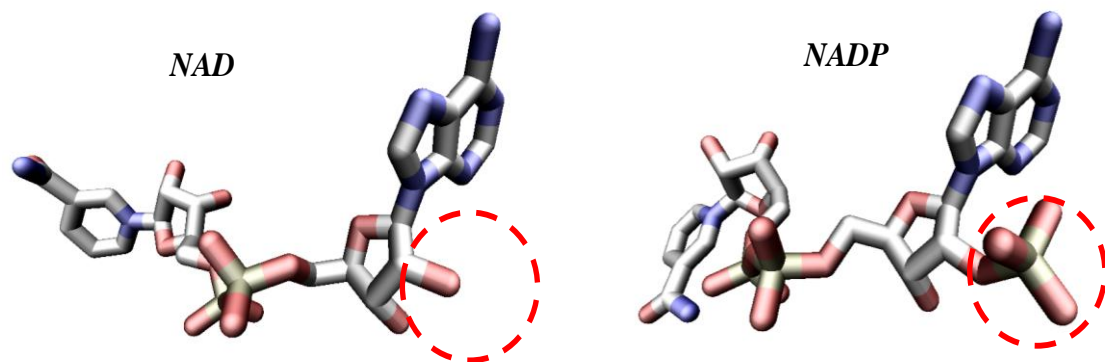


Figura 2. Representación estructural de NAD y NADP. Diferencias estructurales entre NAD y NADP, izquierda y derecha respectivamente, en un círculo rojo punteado se destaca la diferencia entre ambas moléculas.

Además, en *E. coli*, la especificidad por cofactor está relacionada con el dinucleótido utilizado por las enzimas de distintas vías del metabolismo central. Mientras que la glicólisis posee la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa específica por NAD, la rama oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato se compone de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, ambas enzimas específicas por NADP. Además, las reacciones de producción de NADPH se encuentran siempre luego de una bifurcación de la red metabólica (**Figura 3**). Esto le permite a la bacteria regular el flujo de carbono a través de cada ruta y con ello, la cantidad de NADPH producido.

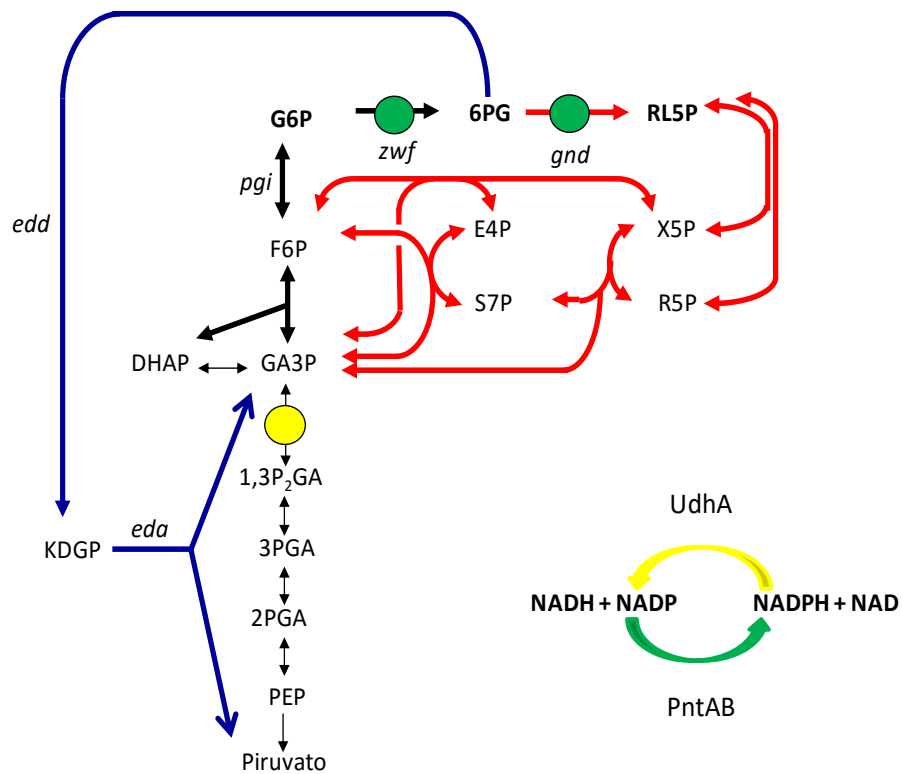


Figura 3. Vías centrales del metabolismo de *E. coli*. En azul se representa la vía Entner-Doudoroff, en rojo la vía de las pentosas fosfato y en negro la vía Embden-Meyerhof. Dentro de ésta, se destaca en negrita la primera mitad de la glicólisis, en amarillo se destacan los puntos de producción de NADH y en verde la producción de NADPH. Además se muestran las transhidrogenasas Udha y PntAB y las reacciones que catalizan. En cursiva se destacan los genes importantes en este trabajo; *pgi*: fosfoglicosa isomerasa, *zwf*: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, *gnd*: 6-fosfogluconato deshidrogenasa, *edd*: 6-fosfogluconato deshidratasa, *eda*: 2-deshidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolasa.

2. Transferencia de equivalentes de reducción entre NAD(H) y NADP(H)

Puesto que NADPH se encuentra acoplado a la tasa de crecimiento o de generación de biomasa, y por lo mismo no existen otras reacciones distintas a las vinculadas con la biosíntesis para reoxidarlo, en organismos como *E. coli* y muchas otras bacterias se da el caso que la producción de NADPH se encuentra por debajo o por sobre la demanda anabólica. *E. coli* es capaz de contrarrestar esta situación mediante dos isoformas de transhidrogenasas: la de membrana (PntAB) y la soluble (UdhA), mostradas en la **Figura 3**. La primera cataliza la transferencia de hidruros desde NADH a NADP de manera acoplada a la fuerza protón motriz para poder ir en contra del equilibrio químico en la célula ya desplazado hacia NAD y NADPH. Mientras que a partir de estos últimos, la segunda transhidrogenasa cataliza la reacción a favor del equilibrio [Fuhrer & Sauer, 2009]. De esta forma, cuando sea necesario, PntAB completa el requerimiento anabólico mediante la producción de NADPH, mientras que en los casos de sobreproducción de este cofactor, UdhA es capaz de contrarrestar esta situación reoxidándolo.

3. Efecto del NADPH sobre el crecimiento

Diversos laboratorios, así como el nuestro, han estudiado cómo es afectado el metabolismo cuando los puntos de producción de equivalentes de reducción como NADH y NADPH son alterados.

Se ha reportado que en *Escherichia coli*, cuando glucosa es la única fuente de carbono, un tercio de la producción total del NADPH proviene de las deshidrogenasas de la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato: la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) [Sauer y cols, 2004].

Cuando glucosa es la única fuente de carbono, como se muestra en la **Tabla 1**, la tasa de crecimiento de la *E. coli* silvestre es $0,67 \text{ h}^{-1}$. Cuando el flujo de carbono es desviado a través de la vía de las pentosas fosfato, mediante la delección del gen *pgi*, la tasa de

crecimiento disminuye hasta $0,18 \text{ h}^{-1}$ (cerca de un tercio) [Sauer y cols, 2004]. Una situación similar ocurre cuando se deletiona sobre *pgi* y el operón Entner-Doudoroff. Esto significa que en estas mutantes se producen dos moléculas de NADPH por cada molécula de glucosa, lo que lleva a una sobreproducción de este cofactor. Cuando además se deletiona el gen *udhA*, que codifica la enzima que reoxida el NADPH, la tasa de crecimiento disminuye a 0 h^{-1} [Sauer y cols, 2004]. Estas modificaciones en la topología de las vías centrales del metabolismo conducen a un desbalance de los cocientes NADH/NAD y NADPH/NADP. La sobreproducción de NADPH por la delección de *pgi* en glucosa como única fuente de carbono conlleva a una disminución en la tasa de crecimiento, conduciendo inclusive a la muerte celular.

Tabla 1. Mutantes construidas de *E. coli* y su máxima tasa de crecimiento durante cultivo en glucosa.

Cepa	Marcador genético conocido	Tasa de crecimiento h^{-1}
MG1655	F ⁻ λ <i>rph-1</i> (nativa)	$0,67 \pm 0,01$
Pgi	MG1655 Δ <i>pgi</i> (fosfoglucoasa isomerasa deficiente)	$0,18 \pm 0,02$
Pgi-EDP	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ (<i>edd eda</i>)	$0,20 \pm 0,03$
Pgi-UdhA	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>UdhA</i>	0

Se ha observado que este efecto deletéreo en el crecimiento producido en cepas Δ *pgi* puede ser revertido mediante la sobreexpresión de la enzima UdhA, o mediante el cambio de especificidad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa codificada por el gen *zwf*. En ambos casos, se contrarresta la sobreproducción de NADPH, lo que recupera parcialmente la tasa de crecimiento desde $0,18 \text{ h}^{-1}$ a $0,27 \text{ h}^{-1}$ [Olavarría y cols, 2014].

Se ha reportado que, bajo condiciones similares de estrés por NADPH, la cepa de *E. coli* Δ *pgi* Δ *UdhA* (incapaz de sobrevivir en medio mínimo usando glucosa como única fuente de carbono) evoluciona a través del cambio en la especificidad por cofactor del complejo NADH deshidrogenasa 1 de la cadena respiratoria de electrones, a través de la mutación puntual E183A en la subunidad NuoF. Esta mutación le permite a la enzima reoxidar tanto

NADH como NADPH en la respiración. Este cambio lleva a un aumento en la tasa de crecimiento desde $0,04 \text{ h}^{-1}$ a $0,24 \text{ h}^{-1}$ [Auriol y cols, 2011].

Es preciso insistir que *en estos trabajos, la recuperación en la tasa de crecimiento se puede generar tanto por la evolución que experimenta la bacteria como por modificaciones que los autores realizan*. En este contexto, como solución a la disminución de la tasa de crecimiento en una cepa *Δpgi*, en nuestro laboratorio se propone cambiar la especificidad por cofactor de las deshidrogenasas de la vía de las pentosas fosfato, desde NADP a NAD, en lugar de someter a la bacteria a evolución. Mientras que para la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se ha logrado el cambio de especificidad, para la 6-fosfogluconato deshidrogenasa no se ha logrado.

Lograr una ruta de las pentosas fosfato con ambas enzimas con especificidad por NAD permitiría entender cómo la bacteria redistribuye de los flujos metabólicos, optimizando los metabolitos generados y el balance de los cofactores redox, cuando existen o no modificaciones en la topología de las vías centrales del metabolismo.

Este trabajo se enfoca en la recuperación de la tasa de crecimiento de una cepa incapaz de sobrevivir en medio mínimo usando glucosa como única fuente de carbono, debido a la alteración en la topología de las vías centrales del metabolismo. Esto se pretende realizar mediante el cambio de especificidad, desde NADP a NAD, de la segunda enzima de la rama oxidativa de las pentosas fosfato: la 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

4. Familia de enzimas 6-fosfogluconato deshidrogenasa

Las 6-fosfogluconato deshidrogenasas (E.C. 1.1.1.44) son enzimas que realizan la descarboxilación oxidativa, dependiente de NADP o NAD, de 6-fosfogluconato (6PG), hacia la formación de ribulosa-5-P y NAD(P)H (**Figura 4A**) [Chen y cols, 2010].

Las enzimas de esta familia están compuestas por dos dominios: el dominio N-terminal, de aproximadamente 170 aminoácidos, el cual presenta un plegamiento tipo Rossmann

(conformado por una sábana beta central, de 6 hebras paralelas, empacada por 7 hélices alfa [Rao y cols, 1973]. Este dominio está implicado en el sitio de unión al dinucleótido. Por su parte, el dominio C-terminal está conformado de α -hélices y está implicado en la unión del 6PG. La enzima de *Escherichia coli* es un homodímero, donde cada monómero tiene un peso molecular aproximado de 52 kDa (**Figura 4B**).

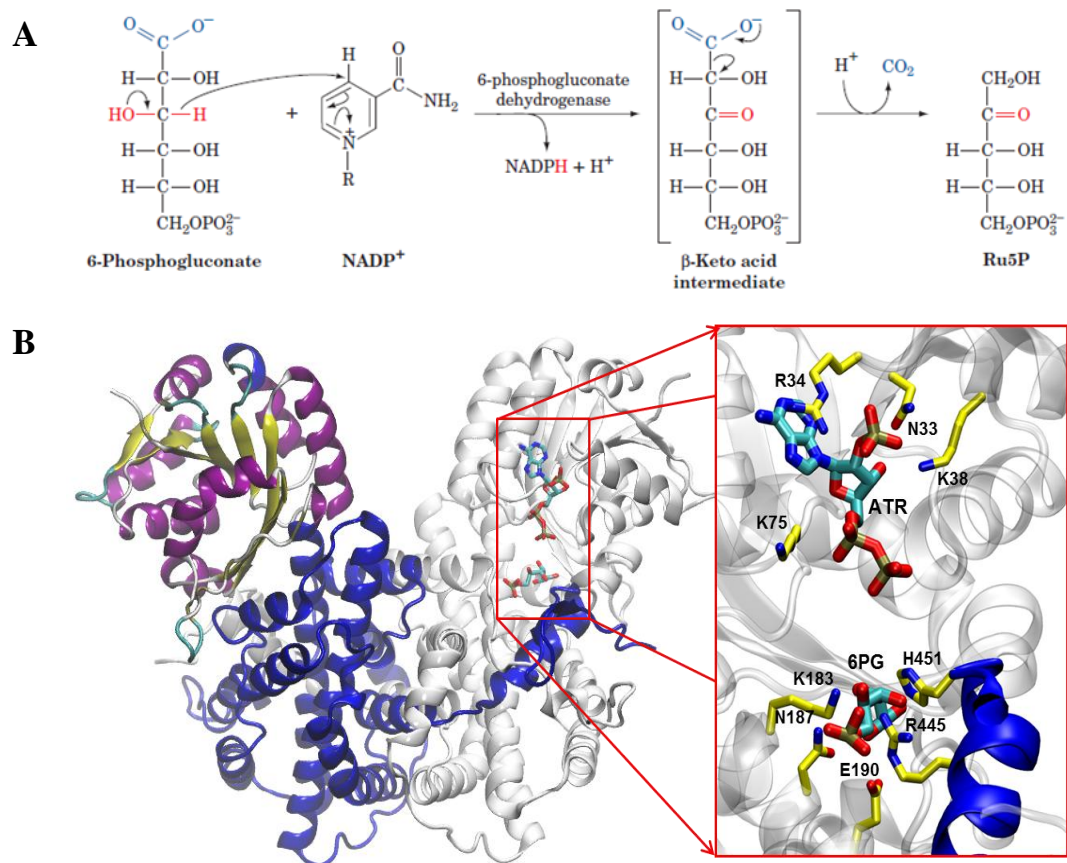


Figura 4. Reacción de oxidación del 6-fosfogluconato y estructura de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *E. coli*. (A) Reacción enzimática de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *E. coli* (tomada de Voet y Voet). (B) Representación de la estructura de la 6PGDH. (Izquierda) En azul y gris se representa cada subunidad de *Ec*6PGDH, en amarillo y púrpura se re representa el plegamiento tipo Rossmann del dominio N-terminal de la cadena azul. (Derecha) Se representan los aminoácidos N33, R34, K38, que interactúan con parte de la molécula de NADP (ATR, molécula que corresponde a NADP sin región ribosa-nicotinamida). Los residuos K183, N187, E190, R445, H45 interactúan con 6PG.

El árbol filogenético de esta familia de enzimas muestra que la primera bifurcación corresponde a una diferencia en su estado oligomérico (**Figura 5**, ramas 1 y 2). A su vez, en cada una de las ramas se puede evidenciar la segregación en dos ramas secundarias, correlacionadas con diferencias en los motivos de secuencia del *loop* $\beta 2-\alpha 2$, el cual forma parte del bolsillo de unión al fosfato 2' del NADP [Maturana, 2014]. Estas ramas se distinguen por la presencia de los residuos NR (**Figura 5**, ramas 3 y 5), cuyos residuos positivos interactúan con el fosfato 2' del NADP, o por la presencia de un residuo aspartato (**Figura 5**, ramas 2 y 4), que indica preferencia por NAD [Carugo y Argos, I, 1997].

Entre las enzimas 6-fosfogluconato deshidrogenasa que poseen estructura conocida, la gran mayoría pertenece al grupo 6PGDH homodiméricas que poseen el motivo NRX₃K en el *loop* $\beta 2-\alpha 2$, incluyendo la estructura de la *Ec6PGDH*. Sin embargo, existe una estructura correspondiente a la enzima de *Geobacter metallireducens* (PDB: 4E21), la cual se ubica dentro del grupo 6PGDH homotetramérica y posee el motivo DVX₃A en el *loop* $\beta 2-\alpha 2$. Dentro de este mismo grupo se encuentra la enzima de *Gluconobacter oxydans*, la cual se caracteriza por ser 6 veces más preferente por NAD que NADP [Adachi y cols, 1982].

Estudios anteriores se han enfocado en lograr el cambio de especificidad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa desde NADP a NAD. De acuerdo a estos estudios [Maturana, 2014], el cambio del motivo NRX₃K, por DVX₃A en la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *E. coli* lleva a una pérdida en la especificidad por NADP, pero no mejora la actividad con NAD. Además, la variante tiene una disminución de la k_{cat} con NADP de más de 200 veces, mientras que la k_{cat} con NAD disminuye sólo a la mitad (**Tabla 2**).

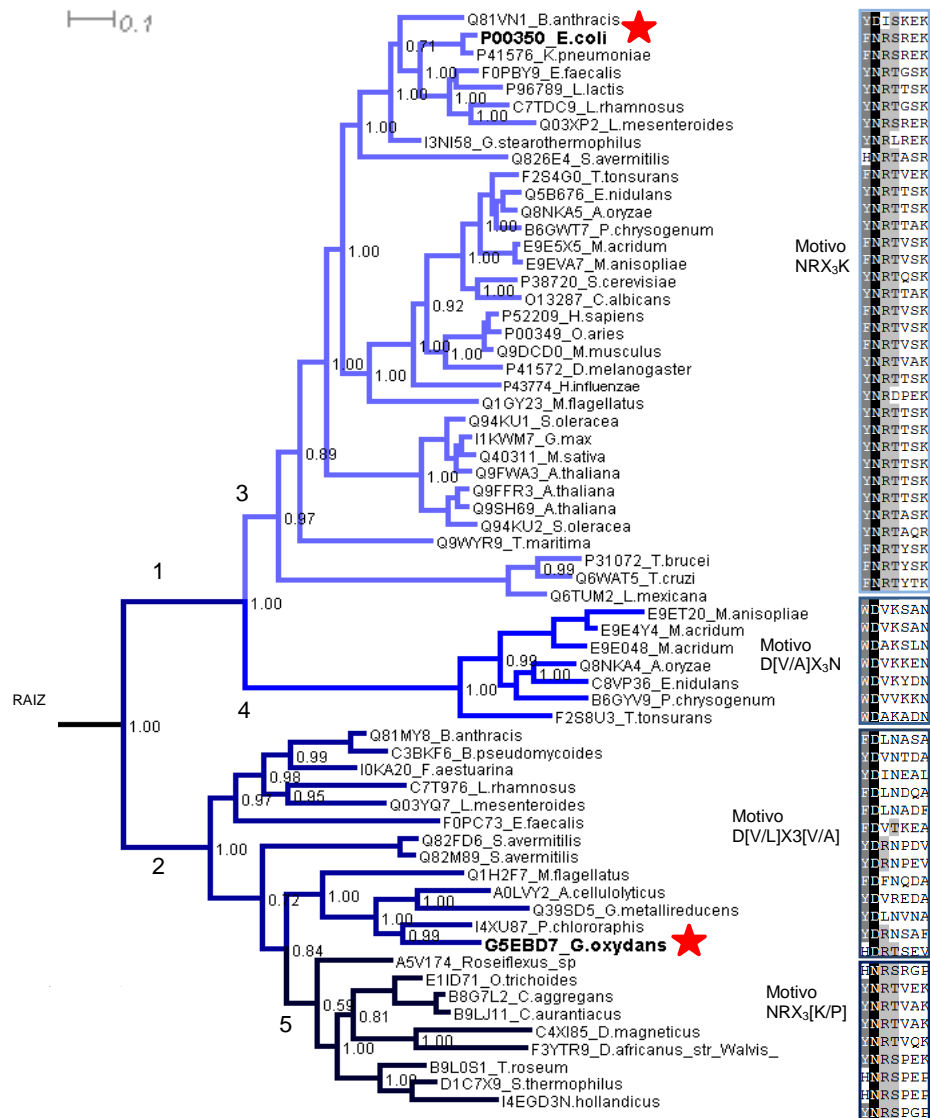


Figura 5. Árbol filogenético de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa. La enzima 3-hidroxi isobutirato deshidrogenasa fue usado como grupo externo (raíz). La familia 6 fosfogluconato deshidrogenasa está dividida en dos ramas principales, aquellas homodiméricas (rama 1) y homotetraméricas (rama 2). Dentro de cada rama es posible observar ramas subdivididas de acuerdo a la presencia de los motivos NRX₃K y D[V/A]X₃A en el loop β₂-α₂ (ramas celeste, azul claro, azul y azul oscuro). Las estrellas rojas representan los dos miembros de las 6PGDHs estudiadas en este trabajo de tesis (extraído de Tesis de Magíster de Maturana, 2014).

Según Cornish-Bowden [1995], cuando dos sustratos se unen al mismo sitio activo, podemos establecer que la razón entre sus velocidades corresponde al cociente entre sus constantes de especificidad. Este cociente se relaciona con la especificidad de una enzima por un sustrato u otro y puede relacionarse en este caso con la contribución del grupo fosfato a la energía de unión sustrato-enzima, indicando si la unión es favorable o desfavorable.

Las constantes de especificidad para la enzima nativa y la mutante se muestran en la **Tabla 2**. Según el valor del cociente entre las constantes catalíticas para NAD sobre NADP de la enzima nativa, nosotros clasificamos esta enzima como específica por NADP, mientras que la variante DVX₃A como específica por NAD. Sin embargo, esta variante no es capaz de producir NADH en condiciones fisiológicas, puesto que la K_M para NAD se encuentra 15 veces por encima de la concentración fisiológica reportada en *E. coli*.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de 6PGDH disponibles en el laboratorio.

	NADP			NAD			
	K _M μM	k _{cat} s ⁻¹	k _{cat} /K _M s ⁻¹ /μM	K _M μM	k _{cat} s ⁻¹	k _{cat} /K _M s ⁻¹ /μM	$\frac{[k_{cat}/K_M]^{NADP}}{[k_{cat}/K_M]^{NAD}}$
<i>Ec</i> 6PGDH ^{WT}	17	41	2,4	32500	46	1,4 E -3	1654
<i>Ec</i> 6PGDH ^{N33D-R34V-K38A}	7200	0,15	2,1 E-5	36700	24	6,5 E -4	0,03
<i>Go</i> 6PGDH	496	41	0,083	86	44	0,51	0,16

No obstante, en el trabajo descrito anteriormente [Maturana, 2014] no se considera que en la misma rama de enzimas homodiméricas, una de las sub-ramas también presenta aspartato en el *loop* β2-α2, identificadas como D[V/A]X₃N en este caso (**Figura 5**, rama 4). Este grupo de enzimas no ha sido caracterizado cinéticamente, pero podría presentar especificidad por NAD. La identificación de residuos conservados en este grupo podría sugerir mutaciones que logren el cambio de especificidad desde NADP a NAD mediante herramientas de ingeniería de proteínas como diseño racional y evolución dirigida.

5. Diseño racional

El diseño racional de proteínas se basa en el conocimiento detallado de la estructura y función de las proteínas para proponer nuevas variantes. Para esto, es necesario el conocimiento previo de la estructura tridimensional de la proteína y de su sitio activo para así manipular la secuencia y obtener mejores propiedades. Otro tipo de información útil para el análisis son las comparaciones de secuencias entre miembros de una familia de enzimas que unen diferente sustrato.

El diseño racional se compone de dos etapas básicamente: la mutagénesis sitio-dirigida y la caracterización de la variante generada.

Dado que se dispone de un árbol filogenético de la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa, en este trabajo se propone que se podrían encontrar residuos candidatos a mutación para la generación de una enzima NAD-específica mediante análisis de traza evolutiva.

6. Evolución dirigida

La evolución dirigida ha emergido como una herramienta de gran alcance para mejorar enzimas presentes en la naturaleza, haciéndolas más convenientes, baratas y efectivas. La técnica fue diseñada como una herramienta para generar nuevas enzimas de manera azarosa y buscar aquellas con características mejoradas para su uso como biocatalizadores aumentando, por ejemplo, la actividad o la termoestabilidad [Arnold y cols, 2001]. Sin embargo, en los últimos años han surgido nuevos métodos en la generación de librerías que permiten el control en la frecuencia de mutaciones y también el estudio exhaustivo de una posición en particular al probar los 20 aminoácidos en aquella posición.

La evolución dirigida se divide principalmente en 3 etapas: la generación de la diversidad genética, la expresión de las variantes obtenidas y la selección de las proteínas con las características deseadas.

La primera etapa consiste en elaborar una librería con variantes del gen inicial. Estos métodos pueden variar de acuerdo a la información disponible respecto a la enzima a trabajar. Cuando no se dispone de información estructural de la proteína, uno de los métodos utilizados es la PCR propensa a error, la cual introduce errores al azar mediante la modulación de factores que afectan la reacción de amplificación, como análogos de dNTP o el uso de Mn^{+2} . Cuando se han identificado posiciones con mejoras en las propiedades en estudio, o se dispone de información estructural de la proteína, uno de los métodos disponibles es la mutagénesis de saturación de sitios. Esta técnica se basa en la amplificación completa del gen de interés usando partidores que contienen un codón degenerado, el cual origina los diferentes codones codificantes para los distintos aminoácidos. Se han reportado diferentes tipos de codones que permiten un control más fino respecto al tipo de aminoácido que quiere ser expresado en la librería. Entre ellos, se encuentra el codón degenerado NNK (N: A, C, T o G; K: G o T), que con tan sólo 32 codones, codifica para los 20 aminoácidos y equipara parcialmente la frecuencia de cada uno (**Tabla 3**).

Tabla 3. Frecuencia codogénica generada por los codones degenerados NNN y NNK.

Codón NNN		Codón NNK	
Frecuencia	Aminoácido	Frecuencia	Aminoácido
6	R, L, S	3	R, L, S
4	A, G, P, T, V	2	A, G, P, T, V
3	I, Stop	1	I, N, D, C, E, Q, H, K, F,
2	N, D, C, E, Q, H, K, F, K		K, M, W, Stop
1	M, W		

La segunda etapa consiste en la expresión de los genes codificantes de las proteínas que se desean obtener, para lo cual es fundamental la elección de un sistema de expresión (vector de expresión y hospedero) adecuado a las características de la proteína. En esta etapa, los clones son crecidos hasta fase exponencial y la inducción de la proteína dependerá del sistema de expresión escogido.

Finalmente, en la tercera etapa se realiza una selección de los clones que expresen las proteínas con las características deseadas. Esta tarea puede realizarse mediante selección *in vivo* o un *screening in vitro* a través de la formación de productos que puedan ser detectados por fluorescencia o absorbancia [Rellos y Scopes, 1994].

6.1. Elaboración de un sistema de *screening*

En general, el concepto de evolución dirigida depende de la disponibilidad de sistemas que permitan identificar variantes interesantes de enzimas dentro de la diversidad genética generada artificialmente. Un prerrequisito para realizar evolución dirigida, dado el alto número de variantes que deben ser analizados, es que estos sistemas permitan la detección de características específicas de la enzima (por ejemplo actividad enzimática) en cultivos a pequeña escala y en condiciones de procesamiento de alto rendimiento [Salazar y Sun, 2003]. Es por ello que, dentro de las etapas de generación de la diversidad molecular y la selección de las secuencias mutantes que realizan la función deseada en la proteína, el proceso de selección es considerado mucho más desafiante. Sin una estrategia de *screening* efectiva, la habilidad para aislar los clones positivos es severamente disminuida.

Un requisito importante para un buen protocolo de *screening* es la disponibilidad de métodos que permitan automatizar el proceso, como el uso de micro placas de 96 pocillos. Algunos métodos incluyen sistemas de detección de alto rendimiento. Además se han desarrollado algunos métodos estadísticos y sistemas para la gestión de datos que permiten evaluar los resultados del proceso de *screening* y manejar el alto número de datos [Salazar y Sun, 2003].

6.2. Enriquecimiento de cultivo

Uno de los métodos de selección utilizados en evolución dirigida es el enriquecimiento de cultivo. Este método permite seleccionar clones dentro de una librería debido a diferencias en sus tasas de crecimiento. Para esto, los clones son cultivados en conjunto y se someten a

ciclos de subcultivos done cada determinado tiempo se toma una alícuota y se cultiva nuevamente en medio fresco. De esta forma, los clones con menor tasa de crecimiento son eliminados y aquellos con mayor tasa de crecimiento son enriquecidos en el cultivo [Schlegel y Jannasch, 1967].

Para el desarrollo de un sistema de selección basado en el enriquecimiento, se plantea la generación de una cepa cuya tasa de crecimiento esté relacionada con la especificidad por dinucleótido de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Para esto, en este trabajo se plantea que el cambio de especificidad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa desde NADP a NAD permitirá una recuperación parcial en la tasa de crecimiento de una cepa $\Delta pgi \Delta udhA$, incapaz de sobrevivir en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono. Como consecuencia, la cepa generada serviría como un sistema de selección de clones de una librería de variantes 6PGDH para obtener una variante con mayor especificidad por NAD. Para nuestro propósito, el gen *pgi* y el operón *edd-eda* serán deleccionados para dirigir el flujo de glucosa exclusivamente a través de la 6PGDH. Por su parte, el gen *udhA* será deleccionado para evitar la reoxidación del NADPH a través de esta transhidrogenasa y el gen *gnd* será deleccionado y complementado con genes codificantes para variantes 6PGDH.

HIPÓTESIS

El cambio de especificidad *in vivo* de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Escherichia coli* desde NADP a NAD, permite una recuperación parcial en la tasa de crecimiento en una cepa $\Delta pgi \Delta udhA$, incapaz de sobrevivir en medio mínimo usando glucosa como única fuente de carbono.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de una 6-fosfogluconato deshidrogenasa con especificidad por NAD, sobre la velocidad de crecimiento de una variante de *E. coli* $\Delta pgi \Delta udhA$, incapaz de crecer en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar variantes de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa mediante mutagénesis sitio dirigida.
2. Generar una cepa de *E. coli* incapaz de sobrevivir en medio mínimo usando glucosa como única fuente de carbono, mediante la delección de los genes *pgi*, *udhA*, *gnd* y el operón *edd-eda*.
3. Evaluar el efecto del cambio de especificidad desde NADP a NAD de las variantes 6PGDH generadas en la cepa mutante *pgi*, *udhA*, *gnd* y el operón *edd-eda*
4. Utilizar la cepa generada como sistema de selección de librería de variantes de la enzima 6PGDH generadas mediante mutagénesis de saturación de sitios.

MATERIALES

1. REACTIVOS

Tabla 4. Reactivos utilizados.

Proveedor	Insumos
Becton Dickisnon (NJ-EEUU)	Peptona
Biorad (CA-EEUU)	Bradford
Biotium (CA-EEUU)	Gel Red
Calbiochem (NJ-EEUU)	PMSF, Glicina, Tween-20, SDS
GE Healthcare (Sweden)	His Trap™ HP
Invitrogen (CA-EEUU)	Genetailor, Acrilamida
IDT (IO-EEUU)	Partidores
Lonza (Basel-Switzerland)	LE Agarosa SeaKem®
Merck (NJ-EEUU)	Azul de Coomssie R-250, APS, Agar, Tris, MgCl ₂ , NaCl, NiSO ₂ , Imidazol.
New England Biolabs®Inc (MA-EEUU)	<i>DpnI</i> , 1Kb ADN Ladder, T4 ADN Ligasa, <i>EcoRV</i>
OMEGA Bio-tek (GA-EEUU)	E.Z.N.A (miniprep kit)
Promega (WI-USA)	Wizard Genomic DNA Purification Kit
Biotium	GelRed™
Stratagene	<i>Pfu</i> UltraII Fusion Polymerase
Fermentas	<i>NcoI</i> , <i>BamHI</i>
Sigma Aldrich	β-mercapto etanol, BSA, NAD(P), 6PG, standard M.W.

TCL (STGO-CHILE)	TEMED
US Biological (MA-EEUU)	IPTG, kanamicina, ampicilina
Winkler (STGO-CHILE)	Glicerol

2. CEPAS BACTERIANAS.

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio y sus propiedades más relevantes se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Cepas bacterianas.

Cepa	Genotipo / Fenotipo relevante	Fuente o Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> M15 <i>endA recA hsdR</i> ($r_K m_K$) <i>supE thi gyrA relA</i> $\Delta(lacZYA-argF)u169$	Stock del laboratorio
BW25113/pKD46	$\Delta(araD-araB)567 \Delta lacZ4787 lacIp-4000(lacI^Q) \lambda-poS396(Am) rph-1 \Delta(rhaD-rhaB) 568 rrnB-3hsdR514$. Cepa portadora del plásmido pKD46	Datsenko y Wanner, 2000
DH5α/pCLF4	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> M15 <i>endA recA hsdR</i> ($r_K m_K$) <i>supE thi gyrA relA</i> $\Delta(lacZYA-argF)u169$. Cepa portadora del plásmido pCLF4	Stock del laboratorio
MG1655	F ⁻ $\lambda^- ilvG^- rfb-50 rph-1$	Stock del laboratorio
MG1655 Δpgi	F ⁻ $\lambda^- ilvG^- rfb-50 rph-1 \Delta pgi::FRT$	Olavarria, 2014
MG1655 Δ^4	F ⁻ $\lambda^- ilvG^- rfb-50 rph-1 \Delta pgi::FRT \Delta(edd-eda)::FRT \Delta udhA::FRT \Delta gnd::kan$	En este trabajo

3. PLÁSMIDOS.

Los plásmidos utilizados en este estudio y sus propiedades relevantes se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Plásmidos utilizados en el presente estudio.

Plásmido	Características	Fuente o Referencia
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo</i> pSC101 ori ^{TS} , Amp ^R	Datsekno y Wanner, 2000
pCLF4	<i>bla</i> FRT <i>aph</i> FRT PS1 PS2 <i>oriR6K</i> , Amp ^R , Kan ^R , promotor T7	Stock de Laboratorio
pCP20	<i>bla cat cI857 IPR flp</i> pSC101 ori ^{TS} , Cam ^R	Datsekno y Wanner, 2000
pET-TEV	f1 ori, Kan ^R , bajo promotor T7 <i>lac</i>	Stock de Laboratorio
pBluescriptII	f1 ori, Amp ^R , pUC ori, bajo promotor <i>lac</i>	Stock de Laboratorio
pTrc99a	oriColE1, Amp ^R , <i>rraA</i> bajo promotor <i>trc</i>	Amann, E. 1988

Vector de expresión pET-TEV

El vector de expresión pET-TEV (**Figura 6**) permite la sobre-expresión de proteínas, mediante la expresión, inducible por IPTG, de la RNA polimerasa del fago T7, la cual se une al promotor del gen a expresar. Esta proteína está codificada en el cromosoma de algunas cepas de *E. coli*, como la cepa BL21(DE3). Sin embargo, este tipo de vector no permite la expresión en cepas bacterianas que carezcan la polimerasa del fago T7, como es el caso de la cepa MG1655.

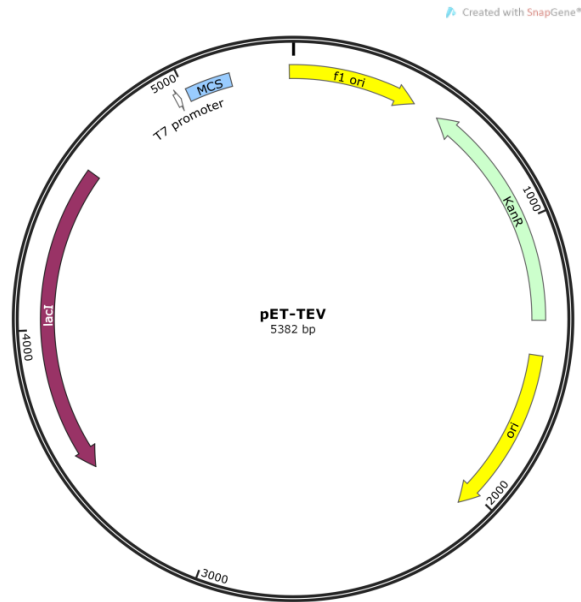


Figura 6. Vector de expresión pET-TEV. F1: ori de ADN de hebra simple derivado del bacteriófago F1, Kan^R: gen de resistencia a kanamicina, ori: origen de replicación, *lacI*: región codificante para el represor LacI, T7 promoter: sitio de reconocimiento de la RNA polimerasa del fago T7, MCS: sitio de múltiple clonamiento.

Vector de clonamiento pBluescript II

El vector de clonamiento pBluescript II posee un sitio de múltiple clonamiento que interrumpe el gen reportero *lacZ*, por lo que la ligación de ADN es fácilmente detectable debido a la coloración de las colonias transformadas con el plásmido cuando se siembran en medio sólido suplementado con X-gal (**Figura 7**).

Vector de expresión pTrc99a

El vector de expresión pTrc99a permite la sobre-expresión de proteínas inducible por IPTG. El vector posee el operador *lac* río arriba del gen clonado y la expresión es mediada por la RNA polimerasa de la propia bacteria, por lo que el sistema es independiente de la cepa que se transforme con el plásmido (**Figura 8**).

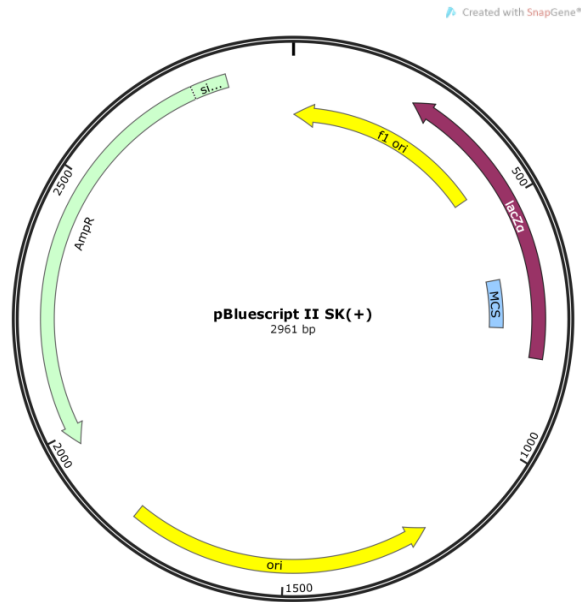


Figura 7. Vector de clonamiento pBluescript II. F1: ori de ADN de hebra simple derivado del bacteriófago F1, Amp^R: gen de resistencia a ampicilina, ori: origen de replicación, *lacZ*: región codificante para la β -galactosidasa interrumpida por el MCS (sitio de múltiple clonamiento).

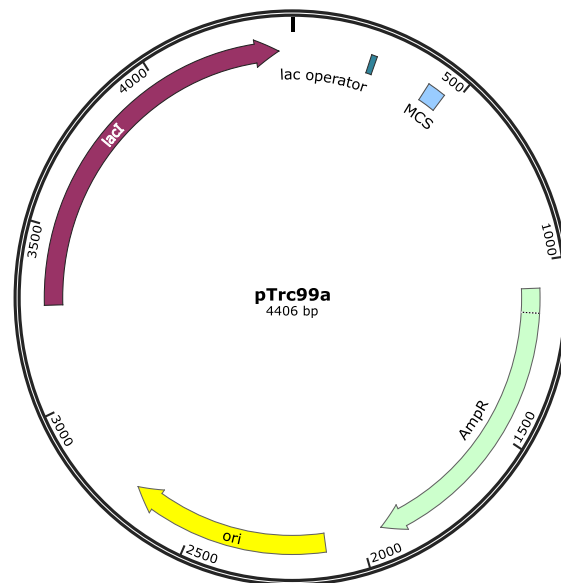


Figura 8. Vector de expresión pTrc99. Amp^R: gen de resistencia a ampicilina, ori: origen de replicación, *lacI*: región codificante para el represor LacI, MCS: sitio de múltiple clonamiento

4. PARTIDORES UTILIZADOS.

Las secuencias de los partidores utilizados se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Partidores utilizados en el siguiente estudio.

Nombre	Secuencia
edd Kan PF	TGCCCGATCGTAGATCGGGCGTTTTGACTTTGTAGGCTGGAGC TGCTTCG
edd Kan PR	TGCTCTGACAACCTCAATTTTCAGGAGCCTTTCATATGAATATCC TCCTTAG
edd200PF	GAGTTTGAGTAATATCTGCGCTTATCC
edd200PR	TGACCAGTCAGAATGTCACGTTTGATA
udh Kan PF	GCAAGAATGGATGGCCATTTTCGATAAAGTTTGTAGGCTGGAG CTGCTTCG
udh Kan PR	TTTTATGTATAAGAACAGGTAAGCCCTACCCATATGAATATCC TCCTTAG
udh200PF	ATTTACTGCAATTCTTTGGCCGGTTCT
udh200PR	TGGAAACTCTGCGCAACATGGTGG
gnd Kan PF	GGCCTCAATTTTATTGTTGATTAAATCAGATGTAGGCTGGAGC TGCTTCG
gnd Kan PR	CGCGGTGACCACCCCTGACAGGAGTAAGTACATATGAATAT CCTCCTTAG
gnd200PF	CGGTGATGTACCGCTGATGGAAG
gnd200PR	GACAAGCCGACATAGCCAGTACCG
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
gnd-NcoI	C'CATGG-GCAGCAGCCATCAT
gnd-BamHI	G'GATCC-TTAATCCAGCCATTCG
gox-BamHI	G'GATCC-TTTATTTCTTTTCGACGTG
S35K PF	ACCGTCTCTATTTTCGACGTTAAGCGTGAGGCGAC
S35K PR	AACGTCGAAAATAGAGACGGTATAACCACGGCT
A38N PF	ATTTTCGACGTTAAGCGTGAGAACACGGAAGAAGTG
A38N PR	CTCACGCTTAACGTCGAAAATAGAGACGGTATA
M11_PF	CGGCGTAGTCGGTNNKGCAGTGATGGGACG
M11_PR	CGTCCCATCACTGCMNNACCGACTACGCCG
V34K35_PF	GTTATACCGTCTCTATTTTCGACNNKNNKCGTGAGAACACGG AAGA
V34K35_PR	TCTTCCGTGTTCTCACGMNMMNNGTCGAAAATAGAGACGGTA TAAC
K75_PF	CGCATCCTGTTAATGGTGNNKGCAGGTGCAGGCA
K75_PR	TGCCTGCACCTGCMNNCACCATTAACAGGATGCG
pTrec99a_prom	GGCAAATATTCTGAAATGAGCTG

pTrc99a_ter	CAAAACAGCCAAGCTTGCATG
-------------	-----------------------

Las secuencias que hibridan con el templado pCLF4 se encuentran subrayadas. Los sitios de corte de enzimas de restricción se encuentran en cursiva. Los codones degenerados utilizados para la mutagénesis sitio-dirigida y de saturación de sitios se encuentran en negrita.

5. MEDIOS DE CULTIVO

Medio líquido *Luria Bertani* (LB)

La composición del medio LB por cada 1 L fue la siguiente: 10 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura sobre 900 mL de agua mili-Q. El pH fue ajustado a 7,0 previo a aforar a 1 L final. Se esterilizó mediante autoclave.

Medio sólido agar LB

Al medio LB se le agregó agar hasta una concentración final de 1,7% p/v y se esterilizó en autoclave.

Medio mínimo M9

El medio mínimo (M9) se utilizó para el crecimiento de las cepas derivadas de MG1655. Se preparó y se autoclavó por separado el M9 base 10X (NH_4Cl 10 g/L, NaCl 5 g/L, Na_2HPO_4 59,8 g/L, KH_2PO_4 30 g/L) y la polisal 1000X ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,8 g/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,2 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,4 g/L, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,1 g/L, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L). Se preparó y se filtró el MgSO_4 2 M (1000X), CaCl_2 0,1 M (1000X), tiamina 30 Mm (10.000X) y glucosa 300 g/L. El medio mínimo se preparó mezclando 10 mL M9 base, 100 μL polisal, 100 μL MgSO_4 , 100 μL CaCl_2 , 10 μL tiamina, glucosa a una concentración final de 5 g/L y aforando a 100 mL con agua nanopura estéril y suplementando con antibióticos y/o IPTG.

Medio sólido agar M9

Para la preparación de 100 mL de medio sólido agar M9 se mezcló 10 mL de M9 base 10X, 100 mL de polisal 1000X, 1,7 gr de agar y 87,8 mL de agua nanopura. La mezcla fue esterilizada en autoclave. Una vez enfriada la muestra cerca de los 65°C, se completó el medio agregando MgSO₄, CaCl₂, tiamina, glucosa, IPTG y ampicilina.

La concentración de antibióticos utilizada fue 50 µg/mL de kanamicina y 100 µg/mL de ampicilina.

MÉTODOS

1. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

Para el análisis de los residuos conservados en las 6PGDHs utilizadas en este estudio, se utilizó el programa **TraceSuite II** (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~jiye/evoltrace/evoltrace.html>), el cual asigna a un árbol filogenético de homólogos de una proteína distintos niveles de conservación para cada posición dentro árbol. Para esto, el programa genera un determinado número de particiones determinadas por un porcentaje de identidad (PIC, de su sigla en inglés de *partition identity cutoff*).

Para cada partición, se definen subgrupos de secuencias establecidas a partir de los nodos que emergen a la derecha de dicha partición en el árbol (**Figura 9A**). En cada subgrupo de secuencias, se genera una secuencia consenso donde se destacan exclusivamente aquellos residuos que se encuentren en todas las secuencias del grupo (**Figura 9B**, columna izquierda). Luego, las secuencias consenso de cada grupo son comparadas con las secuencias consenso de los demás grupos. Cuando un residuo está conservado en todos los subgrupos se indica con la letra del residuo. Cuando una posición está conservada en todos los subgrupos pero ellos difieren en la identidad del residuo, se marca con una X (**Figura 9B**, columna derecha). Por lo tanto, cada partición está definida por una secuencia conservada, la cual puede ser mapeada en una estructura para evaluar la importancia de los residuos en la propiedad que se quiera evaluar.

Se utilizó el archivo de alineamiento del árbol filogenético construido anteriormente [Maturana, 2014], a partir del cual se extrajo las secuencias de enzimas con módulo C-terminal duplicado y se separaron en grupos de acuerdo al motivo presente en el *loop* β 2- α 2: el grupo NRX₃K y el grupo D[V/A]X₃N.

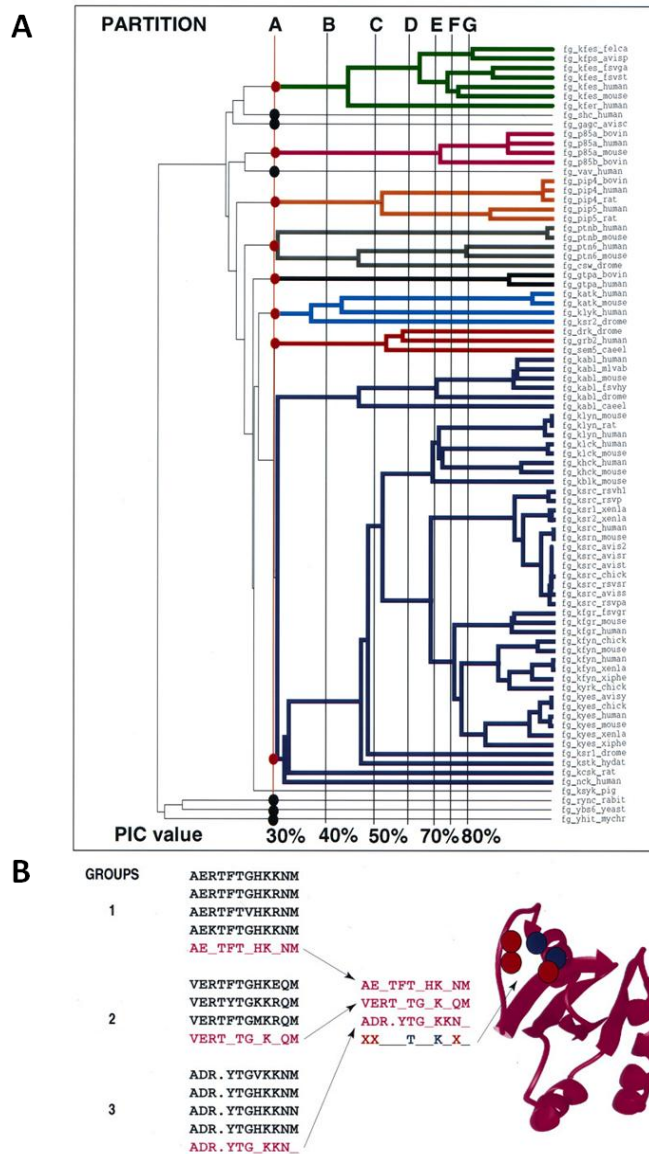


Figura 9. Diagrama de la metodología para el análisis de residuos conservados. (A) Se muestra el árbol de distancias para las secuencias. Los distintos colores indican los diferentes grupos de secuencias que conforman la partición A. **(B)** Se muestran algunas secuencias correspondientes a tres grupos de la partición A. Las flechas indican las secuencias consenso a nivel de grupos, a partir de las cuales se calcula la secuencia consenso a nivel de partición. Los residuos del alineamiento que se conservan de manera total (presencia del mismo residuo) o parcial (presencia de residuos distintos) son representados con el código de una letra para aminoácidos o con una X, respectivamente. La estructura con círculos coloreados representan los residuos que se conservan de manera total o parcial a nivel de la partición (adaptación de Feng y Doolittle, 1987).

Los archivos de alineamiento correspondientes fueron cargados en el programa. Para el caso del grupo de secuencias de enzimas dependientes de NADP, se utilizó la estructura de la 6PGDH de *E. coli* 3FWN para mapear los residuos conservados. Se utilizaron los parámetros asignados por defecto en el programa.

Para evaluar el cambio en el patrón de conservación en la familia, las secuencias conservadas para cada partición fueron extraídas y comparadas entre sí mediante alineamiento de múltiples secuencia. Este procedimiento se realizó para ambos grupos de enzimas.

Para mapear los residuos del sitio activo, el archivo 3FWN fue modificado mediante acoplamiento molecular [Di Nola y cols., 1994] para completar la estructura del NADP y se usó para identificar el subconjunto de residuos conservados que estuvieran a una distancia de 4 Å de la molécula del cofactor.

2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1. Preparación de ADN cromosomal

Las cepas se cultivaron en 3 mL de medio LB (suplementado con antibiótico cuando correspondiera) durante toda la noche a 37°C en un agitador orbital. Se centrifugó 3 mL de cultivo 2 min a 13.000xg. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se sometió a la extracción de ADN genómico utilizando el kit Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega). Brevemente, se resuspendió el sedimento en 600 µL de solución de lisis N, se incubó 5 minutos a 80°C para luego enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 3 µL de solución RNasa y se incubó 37°C por 30 min. Luego, se agregaron 200 µL de solución precipitante de proteínas agitándose en vortex. Se incubó en hielo 5 min y luego se centrifugó 13.000xg por 3 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se agregaron 600 µL de isopropanol. La mezcla fue centrifugada 2 min a 13.000xg. El sobrenadante fue descartado y se agregaron 600 µL de etanol 70%. La mezcla fue

centrifugada nuevamente. Se eliminó el etanol por evaporación a temperatura ambiente. El ADN fue rehidratado con 100 μ L de H₂O nanopura estéril durante 1 hora a 65°C. El ADN obtenido fue conservado a -20°C hasta su uso.

2.2. Preparación de ADN plasmidial

El ADN plasmidial se purificó mediante el uso del kit E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I de Omega Bio-Tek (CA-EEUU), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Finalmente, el ADN plasmidial se resuspendió en 30 μ L de H₂O nanopura estéril. Se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm, de una dilución 1:10 de la muestra purificada, en cubeta de cuarzo. Las concentraciones de las muestras se calcularon mediante la ecuación:

$$[\text{ADN plasmidial}] = \text{Abs } 260\text{nm} \cdot \text{FD} \cdot 50 \text{ (ng/ul)}$$

El grado de pureza de las muestras se estimó usando la relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$, la cual resultó superior a 1,8, indicando un grado de pureza superior al 95% de ADN. Los plásmidos fueron guardados a -20°C hasta su uso.

2.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los geles se prepararon usando agarosa a concentraciones entre 0,8% y 1% en tampón TAE (Tris HCl 40 mM, acetato de 20 mM y EDTA 1 mM) y Gel Red 1X (Biotium, CA-EEUU). Las muestras de ADN a analizar se mezclaron con el volumen adecuado de solución amortiguadora de carga 6X loading dye de Fermentas (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 10 mM, Azul de bromofenol 0,005 % y glicerol 10%) antes de ser cargadas en geles de agarosa. Se incluyó un carril con el estándar de peso molecular MassRuler™ ADN Ladder Mix (Thermo Scientific, CA-EEUU) de 10 kb. Las electroforesis se realizaron a voltaje constante de 100 V (fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad, CA-EEUU). Las bandas de ADN se visualizaron y se fotografiaron sobre un transiluminador UV.

2.4. Amplificación de genes mediante PCR

Para el subclonamiento de genes, éstos fueron amplificados mediante PCR con un par de partidores que incluyen los sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Para esto, se utilizó como templado el plásmido pET-TEV con el gen *gnd* de *E. coli* y de *G. oxydans* disponibles en el laboratorio. Se utilizaron los pares de partidores *gnd*-NcoI/*gnd*-BamHI y *gnd*-NcoI/*gox*-BamHI respectivamente. La reacción se hizo de la siguiente manera

Tampón de PCR 10X	5	μL
MgCl ₂ 50 mM	1,5	μL
dNTPs 10 mM	1	μL
Primer 1 (10 μM)	1	μL
Primer 2 (10 μM)	1	μL
ADN plasmidial (10 ng)	0,5	μL
H ₂ O nanopura	39,7	μL
<i>Pfu</i> II polimerasa	0,3	μL
Volumen final	50	μL

El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturación (94°C x 2 min), 30 ciclos de amplificación (94°C x 30 seg; 55°C x 30 seg; 72°C x 90 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 10 min).

Todas las reacciones de amplificación mediante PCR se realizaron en un termociclador Kyratec SuperCycler® (Kyratec-Australia).

2.5. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones se realizaron utilizando los protocolos sugeridos por el proveedor (Fermentas). Brevemente, se utilizaron las siguientes reacciones:

Tampón Tango 10X	2	μL	Tampón Tango 10X	2	μL
ADN plasmidial (1 μg)	4	μL	ADN plasmidial (1 μg)	4	μL
H ₂ O nanopura	12	μL	H ₂ O nanopura	12	μL
Enzima <i>Bam</i> HI	1	μL	Enzima <i>Eco</i> RV	1	μL
Enzima <i>Nco</i> I	1	μL	Volumen final	20	μL
Volumen final	20	μL			

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 1 hora.

2.6. Purificación de ADN desde un gel de agarosa

Luego de la electroforesis (Métodos de Biología Molecular 2.3.), se utilizó una hoja de bisturí estéril para cortar las bandas de ADN a purificar. El ADN se extrajo usando el kit “UltraClean® 15 DNA purification kit” (Mo Bio), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

2.7. Ligación vector-inserto

Las ligaciones de ADN se realizaron utilizando los protocolos sugeridos por el proveedor (New England Biolabs). Brevemente, se mezcló el vector con el inserto en una razón de masa 1:3. Los reactivos fueron mezclados de la siguiente manera:

Tampón T ₄ ADN Ligasa 10X	2	μL
ADN vector abierto	1	μL
ADN inserto	5	μL
H ₂ O nanopura	11	μL
<u>Enzima T₄ ADN Ligasa</u>	<u>1</u>	<u>μL</u>
Volumen final	20	μL

La reacción de ligación se llevó a cabo a 16°C durante 16 horas.

2.8. Test de inducción 6-fosfogluconato dehidrogenasa de *G. oxydans* y *E. coli*

Los plásmidos pTrc99a con el gen *gnd* nativo de *E. Coli* y *G. oxydans* y las variantes de *E.coli*, fueron electrotransformados en las cepas MG1655 $\Delta pgi \Delta(edd-eda) \Delta udhA \Delta gnd::kan$ y sembradas en agar LB suplementado con ampicilina y kanamicina. Para cada cepa transformada se seleccionaron 3 colonias al azar, las cuales fueron cultivadas en LB suplementado con kanamicina y ampicilina hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Se agregó IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Luego, se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes tiempos y se centrifugaron a 5.000xg por 10 min. El sedimento fue resuspendido

en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y fue sonificado 3 min con pulsos de 15 segundos y dejando en hielo por 60 segundos. Finalmente, se centrifugó a 15.000xg por 30 min y se conservó el sobrenadante. Este extracto crudo fue utilizado para confirmar la expresión de las enzimas mediante SDS-PAGE y determinar de actividad enzimática.

Adicionalmente, como control se trató de la misma manera la cepa $\Delta pgi \Delta(edd-eda) \Delta udhA gnd^+$ para medir la actividad de la enzima nativa expresada a partir de su promotor cromosomal y sus niveles de producción mediante SDS-PAGE.

2.9. Mutagénesis sitio-dirigida

Para las mutaciones sitio específicas se utilizó el sistema Genetailor™ de Invitrogen (CA-EEUU). El procedimiento consiste en la amplificación por PCR del plásmido pET-TEV que contiene el fragmento de interés. Se utiliza un par de partidores, uno de ellos contiene el codón mutagénico (Partidores S35K PF y A38N PF, ver **Tabla 7**). El procedimiento utiliza como molde el plásmido de doble hebra proveniente de una cepa DH5 α , la cual es metilada específicamente en el nucleótido de adenina en la secuencia GACT [M1]. En este trabajo se utilizó como templado el plásmido pET-TEV con la variante N33D-R34A-K38A del gen *gnd* generada anteriormente (Maturana, 2014).

Luego de la reacción de amplificación, se somete la mezcla de PCR a digestión con la enzima *DpnI*, la cual reconoce metilaciones en la secuencia GACT, degradando así los plásmidos parentales. Los productos lineales de PCR fueron transformados en células DH5 α , las cuales recircularizan los amplicones formando el plásmido con la mutación deseada. La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera

Tampón de PCR 10X	2,5	μL
MgCl ₂ 50 mM	1,5	μL
dNTPs 10 mM	1	μL
Templado (30 ng)	0,5	μL
H ₂ O	14,3	μL
Primer 1 (10 μM)	2,5	μL
Primer 2 (10 μM)	2,5	μL
<i>Pfu</i> II ADN polimerasa	0,2	μL
Volumen final	25	μL

Se utilizó un protocolo de amplificación que consistía de una etapa inicial de denaturación a 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 20 segundos a 95°C; 20 segundos de alineación a la temperatura de apareamiento de los partidores utilizados y una etapa de extensión a 72°C por 2 minutos. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, resultando por lo general en una única banda de amplificación con una migración electroforética cercana a los 7,2 kb, correspondiente al tamaño del plásmido pET-TEV-*gnd* en su forma lineal.

Usando cada reacción de PCR, se transformó células electrocompetentes de *E. coli* DH5α, recuperando 1 hora en LB a 37°C. Luego se sembró en medio sólido LB suplementado con ampicilina y se incubaron a 37°C durante cerca de 16 horas, obteniéndose colonias en todos los casos. Tres colonias resultantes de cada transformación fueron sometidas a extracción de ADN plasmidial mediante kit de miniprep (Omega). Muestras de 50 ng/μl en 15 μL fueron enviadas a secuenciar por MacroGen Inc. (Maryland, EEUU). En la secuenciación se usaron los partidores universales del promotor y terminador del fago T7, ubicados río arriba y río abajo respectivamente del gen *gnd* en nuestro vector de expresión. Los cromatogramas de secuenciación fueron analizados con el programa Geneious v4.8 y las secuencias finales fueron contrastadas con la secuencia de la variante N33D-R34V-K38A del gen *gnd* de *E. coli* para corroborar la adquisición de la mutación y descartar la presencia de mutaciones secundarias.

2.10. Mutagénesis de saturación de sitios

Para las mutaciones de saturación de sitios, se utilizó el protocolo establecido en el laboratorio del Dr. Ulrich Schwaneberg. La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 50 μL de acuerdo al siguiente protocolo:

Tampón de PCR 10X	5	μL
MgCl_2 50 mM	1,5	μL
dNTPs 10 mM	1	μL
Templado	0,5	μL
H_2O	37,5	μL
<i>Pfu</i> II ADN polimerasa	0,5	μL
Volumen final	46	μL

Esta mezcla de reacción fue separada en dos tubos con 23 μL cada uno, agregando en cada tubo 2 μL de un partidor. Se utilizó un protocolo de amplificación que consistía de dos etapas: una etapa inicial de denaturación a 98°C por 30 segundos, seguida por 2 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 10 segundos a 98°C; 30 segundos de alineación a 55°C, y una etapa de extensión a 72°C por 2 minutos. Luego se pausa a 8°C y los tubos son mezclados entre si y nuevamente separados en dos tubos con 25 μL . La segunda etapa consistió en 14 ciclos de amplificación que incluían 3 etapas: 10 segundos a 98°C; 30 segundos de alineación a 55°C y una etapa de extensión a 72°C por 2 minutos. Finalmente, se realizó una etapa de extensión de 5 minutos a 72°C y luego las muestras fueron almacenadas a 8°C hasta su uso. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, resultando en una única banda de amplificación con una migración electroforética cercana a los 5,8 kb, correspondiente al tamaño del plásmido pTrc99a::*gnd* en su forma lineal. Los productos de PCR fueron digeridos con *DpnI* a 37°C durante 2 horas y luego se procedió a su purificación usando el kit “UltraClean® 15 DNA purification kit” (Mo Bio), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante..

3. MÉTODOS DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

3.1. Transformación de cepas mediante electroporación

3.1.1. Preparación de células electrocompetentes. Se prepararon células electrocompetentes usando bacterias cultivadas en medio LB con agitación a 37°C hasta una DO₆₀₀ de 0,5. Se centrifugaron 50 mL del cultivo a 5.000xg por 10 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 15 mL de glicerol 10%. Se centrifugó nuevamente a 5.000xg por 10 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 3 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 mL de glicerol 10%. Se alicuotó en tubos con 100 µL. Las cepas DH5α fueron almacenadas a -80°C, mientras que las cepas derivadas de MG1655 fueron utilizadas inmediatamente.

3.1.3. Electrotransformación de células. Se mezcló 95 µL de células DH5α electrocompetentes con 1 µL de ADN plasmidial, u 80 µL de células MG1655 electrocompetentes con 5 µL de ADN lineal, usando cubetas de electroporación con 2 mm de separación entre los electrodos. Se utilizó un electroporador GenePulser Xcell (Biorad) en condiciones de voltaje 2,4 KV, capacitancia 25 µF y resistencia de 200 Ohm. Las células electroporadas fueron resuspendidas en 900 µL de medio LB, incubándose en tubos de microcentrífuga durante 1 hora a 37°C con agitación. Luego de la incubación, se centrifugó a 10.000xg por 10 minutos, se removió el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 100 µL de medio LB y luego sembradas en medio agar LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Las placas fueron incubadas a 37°C por cerca de 16 horas hasta obtener crecimiento de colonias.

3.2. Delección de elementos cromosomales

Para la construcción de la cepa deseada, se realizaron las deleciones de los genes *edd-eda*, *udhA* y *gnd*. Las mutantes se obtuvieron por reemplazo alélico del gen correspondiente por un *cassette* génico que otorga resistencia a kanamicina. El reemplazo se realizó mediante

una técnica que involucra la recombinación homóloga de productos de PCR utilizando el sistema de recombinación Red del fago Lambda [Datsenko y Wanner, 2000].

3.2.1. Obtención del producto de PCR. Se diseñaron partidores de aproximadamente 60 pb, cuyos extremos 5' contenían 40 nucleótidos idénticos a las regiones que flanquean al gen a mutar. Por otra parte, el extremo 3' de los partidores contenía 20 nucleótidos cuya secuencia apareaba con secuencias presentes en el plásmido pCLF4 (ver **Tabla 6**). Este plásmido posee clonado el *cassette* génico compuesto por el gen *aph* flanqueado por secuencias FRT. La amplificación de este *cassette* se realizó según el siguiente protocolo, utilizando los partidores de la **Tabla 7** (para *edd-eda* se usaron los partidores *edd Kan PF/edd Kan PR*, para *udhA* *udh Kan PF/udh Kan PR*, para *gnd* *gnd Kan PF/gnd Kan PR*) y como templado el plásmido pCLF4.

Tampón de PCR 10X	5	μL
MgCl ₂ 50 mM	1,5	μL
dNTPs 10 mM	1	μL
Primer 1 (10 μM)	1	μL
Primer 2 (10 μM)	1	μL
ADN plasmidial (10 ng)	0,5	μL
H ₂ O nanopura	39,7	μL
<i>Pfu</i> II polimerasa	0,3	μL
Volumen final	50	μL

El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturación (94°C x 2 min), 30 ciclos de amplificación (94°C x 30 seg; 55°C x 30 seg; 72°C x 90 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 10 min). Los productos de amplificación se purificaron con el kit “QIAquick PCR purification kit” (Qiagen). Estos productos fueron dializados en membranas de nitrocelulosa con poros de 0,45 μm.

3.2.2. Transformación de *E. coli* con el plásmido pKD46. La mutagénesis se realizó sobre *E. coli* MG1655 transformada con el plásmido pKD46 (**Tabla 2**). Este plásmido contiene los genes que codifican las subunidades de la recombinasa Red del fago λ bajo el control del promotor *P_{araBAD}*, inducible por arabinosa. Además, posee un origen

de replicación termosensible. Para obtener la cepa MG1655/pKD46, se prepararon células electrocompetentes según el punto 2.2.4., pero con la diferencia que las incubaciones post electrotransformación se realizaron a 30°C para conservar el plásmido pKD46 termosensible. Finalmente, se seleccionaron varios de los clones resistentes a ampicilina para el siguiente paso.

3.2.3. Transformación de la cepa *E. coli* MG1655/pKD46 con el producto de PCR. Se cultivó una mezcla de clones MG1655/pKD46 y se cultivó en 3 mL de LB suplementado con ampicilina y glucosa al 0,2%. Las células fueron cultivadas a 30°C por cerca de 16 horas. Luego, se tomó 1 mL de este cultivo y se subcultivó en 50 mL de LB suplementado con ampicilina. Una vez alcanzada una DO₆₀₀ de 0,6 se agregó arabinosa hasta una concentración final de 10 mM. Luego de 1,5 horas, el cultivo fue centrifugado y lavado con glicerol para la preparación de células electrocompetentes, como se describió anteriormente. Se mezclaron 80 µL de bacterias con 10 µL de producto de PCR concentrado y dializado. Las transformantes fueron recuperadas en LB a 37°C por 1 h, para luego ser seleccionadas a 37°C en placas de agar LB suplementadas con kanamicina. El plásmido pKD46 se eliminó aislando repetidamente las transformantes en placas de agar LB suplementadas con kanamicina a 37°C. Finalmente, se seleccionaron aquellas colonias sensibles a ampicilina y resistentes a kanamicina.

3.2.4. Confirmación de la delección mediante PCR. El reemplazo alélico en cada mutante generada se confirmó mediante una reacción de PCR utilizando un partidor interno del *cassette* de resistencia a kanamicina (K1) y partidores que apareaban en regiones ubicadas a 200 pb río abajo del sitio del reemplazo (para *edd-eda* se usaron los partidores K1/edd200PR, para *udhA* K1/udh200PR y para *gnd* K1/gnd 200PR, ver **Tabla 7**). Como templado se utilizó 2 µL de una suspensión de una colonia en 100 µL de H₂O. La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera:

SapphireAmp Fast PCR Master Mix (2X)	12,5	μL
Primer 1 (10 μM)	0,5	μL
Primer 2 (10 μM)	0,5	μL
Templado	2	μL
H ₂ O	10,5	μL
Volumen final	25	μL

El programa de amplificación utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización (94°C x 10 min), 30 ciclos de amplificación (94°C x 30 seg; 55°C x 30 seg; 72°C x 180 seg) y un ciclo de elongación final (72°C x 10 min). Como control se realizó la reacción de PCR utilizando una suspensión de *E. coli* MG1655 nativa. La amplificación se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%.

3.2.5. Delección del *cassette* de kanamicina. Las cepas con la delección del gen en estudio fueron transformadas con el plásmido pCP20, el cual codifica la recombinasa FLP que reconoce y recombina los sitios FRT (ver **Tabla 2**). Este plásmido posee un origen de replicación termosensible, por lo que se recuperó de la electrotransformación y se sembró a 30°C utilizando ampicilina para la selección de transformantes. Para inducir la expresión de la recombinasa FLP y a la vez, curar el plásmido pCP20, se tomaron colonias aisladas y fueron crecidas en LB sin antibiótico a 37°C. Para corroborar la escisión del *cassette* de kanamicina y la curación del plásmido, se tomó una alícuota de este cultivo y se sembró en agar LB. Desde esta placa se tomaron colonias aisladas y se rayaron en agar LB suplementado con ampicilina, kanamicina y sin antibiótico. Las placas fueron incubadas a 30°C, 37°C y 37°C, respectivamente. Las cepas sensibles a ambos antibióticos fueron seleccionadas para los procedimientos posteriores.

3.2.6. Confirmación de la delección del *cassette* de kanamicina mediante PCR. Se tomaron aquellas colonias con fenotipo sensible a ambos antibióticos y se confirmó el genotipo mediante una reacción de PCR utilizando un par de partidores que aparean en regiones ubicadas a 200 pb río arriba y río abajo de sitio del reemplazo (para *edd-eda* se usaron los partidores *edd200PF/edd200PR*, para *udhA* *udh200PF/udh200PR*, para *gnd* *gnd200PF/gnd 200PR*, ver **Tabla 7**). Como templado se utilizó 2 μL de una

suspensión de una colonia en 100 μL de H_2O . La reacción de PCR se realizó de la manera descrita en el punto 2.3.2.4.

3.3. Deleciones de múltiples elementos cromosomales

La generación de la cepa con deleciones de los genes *pgi*, *edd-eda*, *udhA* y *gnd* se realizó iterando la metodología descrita anteriormente (Métodos 3.2.), introduciendo las siguientes modificaciones.

3.3.1. Obtención del producto de PCR. Se utilizaron partidores que aparean en regiones ubicadas a 200 pb río arriba y río abajo del sitio del reemplazo (para *edd-eda* se usaron los partidores *edd200PF/edd200PR*, para *udhA* *udh200PF/udh200PR*, para *gnd* *gnd200PF/gnd 200PR*, ver **Tabla 7**). Como templado se utilizó el ADN genómico purificado desde las cepas con la deleción del gen correspondiente que aún mantenía el *cassette* de resistencia a kanamicina. La reacción se realizó de la siguiente manera:

Tampón de PCR 10X	5	μL
MgCl_2 50 mM	1,5	μL
dNTPs 10 mM	1	μL
Primer 1 (10 μM)	1	μL
Primer 2 (10 μM)	1	μL
ADN genómico	1	μL
H_2O nanopura	39,2	μL
<i>Pfu</i> II polimerasa	0,3	μL
Volumen final	50	μL

Las deleciones se realizaron sobre la cepa Δpgi generada anteriormente [Olavarria y cols, 2014]. El orden de las cepas generadas fue:

1. $\Delta pgi \Delta(edd-eda)::kan$
2. $\Delta pgi \Delta(edd-eda)::\text{FRT}$
3. $\Delta pgi \Delta(edd-eda)::\text{FRT} \Delta udhA::kan$
4. $\Delta pgi \Delta(edd-eda)::\text{FRT} \Delta udhA::\text{FRT}$
5. $\Delta pgi \Delta(edd-eda)::\text{FRT} \Delta udhA::\text{FRT} \Delta gnd::kan$

4. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE *Ec6PGDH* NATIVA Y MUTANTES

4.1. Purificación de 6-fosfogluconato deshidrogenasa

Se inoculó 1 L de LB suplementado con kanamicina y tetraciclina con *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pET-TEV-*gnd*(N33D-R34V-S35K-K38N). Se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5. Luego, fue inducido con IPTG 1 mM y se mantuvo la incubación por 4 horas más. Pasado este tiempo, las células fueron colectadas por centrifugación a 5.000xg por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron suspendidas en 10 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 y 40 mM de imidazol, el cual se suplementó con el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1 mM. Para lisar las células y liberar el contenido intracelular, se utilizó un sonicador Branson Digital Sonifier® (CA-EEUU), con una sonda de 3,2 mm. Se realizaron 12 pulsos de 15 segundos con una amplitud de 30 %, con 1 minuto de pausa entre cada pulso en hielo. Luego, el extracto obtenido se centrifugó a 15.000xg, a 4°C por 30 minutos.

Los extractos que contenían las proteína de interés se sometieron a una cromatografía de afinidad a Ni⁺² usando una columna HisTrap™ HP de 5 ml (GE Healthcare) acoplado a un sistema Äkta. Cargado el extracto, la columna fue lavada con 5 volúmenes de solución de resuspensión y eluida en un gradiente de 40 a 500 mM de imidazol. Las fracciones con mayor absorbancia a 280 nm se colectaron y se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford. Para confirmar la homogeneidad de la preparación de la enzima, se realizó un análisis de SDS-PAGE, comprobando la pureza de cada una de las fracciones.

4.2. Determinación de concentración de proteínas

Las determinaciones fue llevada a cabo por el método de Bradford, midiendo absorbancia a 596 nm, utilizando una curva de calibración con BSA.

4.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE)

El análisis de las masas moleculares sobre las muestras de proteína de cada etapa de la purificación, se realizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalantes en una cámara vertical Mini PROTEAN® 3 cell (BioRad). Las muestras se mezclaron con un amortiguador de carga 4 X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glicerol 4 % v/v, SDS 8 % p/v, β -mercapto etanol 2,8 mM y azul de bromofenol 4 %) y diluyendo con agua. Las muestras se prepararon a 1 mg/mL y se calentaron a 100°C por 5 minutos.

Posteriormente, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 15 %. Las electroforesis se realizaron a corriente constante de 30 mA por 1 hora aproximadamente, hasta el momento antes de la caída del frente de migración (fuente de poder powerPac™ Basic, de Biorad, CA-EEUU). Como amortiguador de electroforesis se utilizó Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v).

Realizada la electroforesis, se tiñó el gel con azul brillante de Comassie R-250 0,3 % p/v disuelto en una mezcla de metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v, durante dos horas con agitación constante. El gel se destiñó con la misma mezcla sin Comassie, hasta obtener un contraste claro de las bandas. La masa molecular relativa de las proteínas se determinó a partir de su migración electroforética. Se utilizó el estándar SigmaMarker™ Low Range (Sigma) que contiene 7 proteínas patrón de masa molecular conocida: 66, 45, 36, 29, 24, 20 y 14,2 kDa.

4.4. Determinación de la actividad enzimática de extracto

La actividad enzimática de extractos se determinó en una mezcla de reacción que contenía: amortiguador Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, NAD 2 mM, 6PG 2 mM a pH 8,0. Durante la reacción enzimática, se monitoreó la formación de NADH a 25°C por medio del aumento en la absorbancia a 340 nm. Utilizando el coeficiente de extinción de 5186 U.A. M⁻¹ cm⁻¹, se calculó la actividad de la enzima como el número de μmoles de NADH formados por minuto y por miligramo de proteína en el extracto, lo que equivale a una unidad de enzima (U).

4.5. Determinación de velocidad inicial

Los ensayos cinéticos se realizaron en un espectrofotómetro Biotek Synergy 2 UV-visible a 25°C, con dos inyectores utilizando placas Nunc® de 96 pocillos (modelo 269620), las cuales tienen propiedades adecuadas de transmitancia y baja adsorción de proteínas.

Se generó un protocolo a través del software Gen5 del espectrofotómetro, para realizar las mediciones cinéticas. En todos los casos, la reacción siempre fue iniciada con la adición de enzima. Se realizaron tres réplicas para cada concentración, con cinéticas de 30 segundos a una tasa de adquisición de datos que resultaba en 334 observaciones totales (una determinación cada 9 centésimas de segundo). Se midió la absorbancia a 340 nm antes y al final del experimento para calcular el sustrato consumido. Adicionalmente, el espectrofotómetro midió la longitud del paso óptico de cada pocillo para normalizar las mediciones a una longitud de paso óptico de 1 cm.

Para las mediciones de velocidad inicial para *Ec6PGDH* a distintas concentraciones de sustrato, se utilizaron mezclas con 12 concentraciones de NAD, cubriendo un rango de 2 μM a 18000 μM. Por sobre la cota superior de concentración de este nucleótido se observa el artefacto óptico “*straylight*” [50], descartándose esos puntos. El rango de concentración de 6PG usado fue desde 0,2 mM a 8 mM.

4.6. Determinación de las constantes cinéticas aparentes

Las constantes cinéticas de la enzima silvestre y de las enzimas mutantes se calcularon a partir de mediciones de velocidad inicial (V_0) a diferentes concentraciones de sustrato $[S]$ (ver resultados), ajustando los datos al modelo cinético de Michaelis-Menten descrito por la ecuación:

$$V_0 = \frac{V_{MAX} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde,

$$V_{MAX} = k_{cat} \times E_T \quad (\text{Ecuación 2})$$

En esta ecuación, la constante de Michaelis (K_M) corresponde a la concentración de sustrato a la cual $V_0 = \frac{1}{2} V_{MAX}$. La V_{MAX} por su parte, es la velocidad máxima que puede alcanzar la reacción catalizada por la enzima y a su vez, equivale al producto de la constante catalítica k_{cat} por la concentración de enzima total (E_T). Específicamente, la k_{cat} se calcula por medio de la ecuación:

$$k_{cat} (seg^{-1}) = \frac{V_{MAX} \times PM_{6PGDH} \times 0.001}{60} \quad (\text{Ecuación 3})$$

V_{MAX} es la velocidad máxima expresada en unidades de $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de enzima; PM el peso molecular de la enzima 6PGDH expresado en g/mol; 0,001 el factor de conversión para convertir los g/mol en mg/ μmoles y 60 el factor de conversión para convertir los minutos a segundos. Finalmente, la k_{cat} se expresa en s^{-1} .

Los ajustes a los datos cinéticos fueron realizados en el programa SigmaPlot 11.0

RESULTADOS

1. Análisis de residuos conservados en la familia 6PGDH

La familia de 6-fosfogluconato deshidrogenasas muestra grupos filogenéticos bien definidos por motivos de secuencia conservados alrededor del bolsillo de unión a dinucleótido (**Figura 5**) [Maturana, 2014]. Se especula que estos grupos difieren en su especificidad por NAD y NADP. En este trabajo, nuestra estrategia consistió en identificar un conjunto de residuos que participen de interacciones directas con el cofactor y que estén conservado al interior de los grupos NRX₃K y D[V/A]X₃N.

Se tomó un total de 36 secuencias del grupo NRX₃K y 7 secuencias del grupo D[V/A]X₃N. Para ambos grupos de secuencias se generaron las particiones a lo largo del árbol mediante el uso del servidor TraceSuiteII. Para el caso del grupo NRX₃K se generaron 10 particiones. Por otra parte, para el grupo D[V/A]X₃N sólo se pudo generar 7 particiones (**Figura 10A**). Se hizo el alineamiento de secuencias consenso para cada partición y se compararon ambos grupos.

Para centrar el estudio en la zona de la proteína que interactúa con el cofactor, se seleccionaron regiones que contuvieran un subconjunto de residuos que estuviera a una distancia de 4 Å del NADP en la estructura de la *Ec6PGDH*. El análisis comparativo entre ambos grupos se enfocó entonces en 3 *loops* cercanas al cofactor (**Figura 10B-C**), incluyendo el *loop* β2-α2 mencionado anteriormente. Los dos *loops* restantes se encuentran ubicadas hacia los extremos N y C terminal de la proteína, respectivamente. El análisis de traza evolutiva, restringido por distancia, nos permitió descartar aquellos residuos conservados que fueran idénticos entre los grupos NRX₃K y D[V/A]X₃N. Así, nos enfocamos exclusivamente en posiciones que se encuentran conservados en un grupo y no en el otro y que estén a una distancia igual o menor a 4 Å del NADP.

En el *loop* $\beta 1-\alpha 1$ existen 4 residuos que cumplen con las condiciones anteriores: M11, A12, V13 y M14. Estas tres posiciones poseen distintos grados de conservación en el grupo NRX₃K, siendo mayor la conservación para la V13, luego la A12 y finalmente la M11. Por otra parte, en el grupo D[V/A]X₃N no existen posiciones con alta conservación (**Figura 10C**). Entre las tres posiciones conservadas en el grupo NRX₃K se escogió M11 para una primera ronda de mutagénesis por saturación de sitios, debido a que este residuo interacciona con la región adenosina mientras que A12 y V13 se orientan más hacia la región nicotinamida ribosa del cofactor.

En el *loop* $\beta 4-\alpha 4$ se da una situación compleja, puesto que existen residuos que se encuentran a una distancia de 4 Å del NADP, pero no existen residuos conservados en ninguno de los dos grupos. Las dos posiciones más destacadas son V74 y K75, las cuales aparecen en el análisis de traza evolutiva como una R y X, respectivamente (**Figura 10C**). Entre estas dos posiciones, se escogió K75 para una primera ronda de mutagénesis por saturación de sitios dado que este residuo interacciona con la región adenosina-difosfato.

Una situación diferente fue observada en el *loop* $\beta 2-\alpha 2$. Como fue descrito anteriormente [Maturana, 2004], N33 se encuentra conservada en el grupo NRX₃K, mientras que en el grupo D[V/A]X₃N se observa D en esa posición. En la posición 38, en el primer grupo aparece K en las últimas particiones, mientras que en el segundo aparece N desde la primera partición. El residuo R34 se encuentra conservado en el primer grupo pero es variable en el segundo. En el caso del residuo S35, es variable en el grupo NRX₃K pero se observa K desde las últimas particiones del grupo D[V/A]X₃N (**Figura 10C**). Con estas observaciones, se evaluó el efecto que tendría el reemplazo del motivo NRSX₂K por el motivo DVKX₂N.

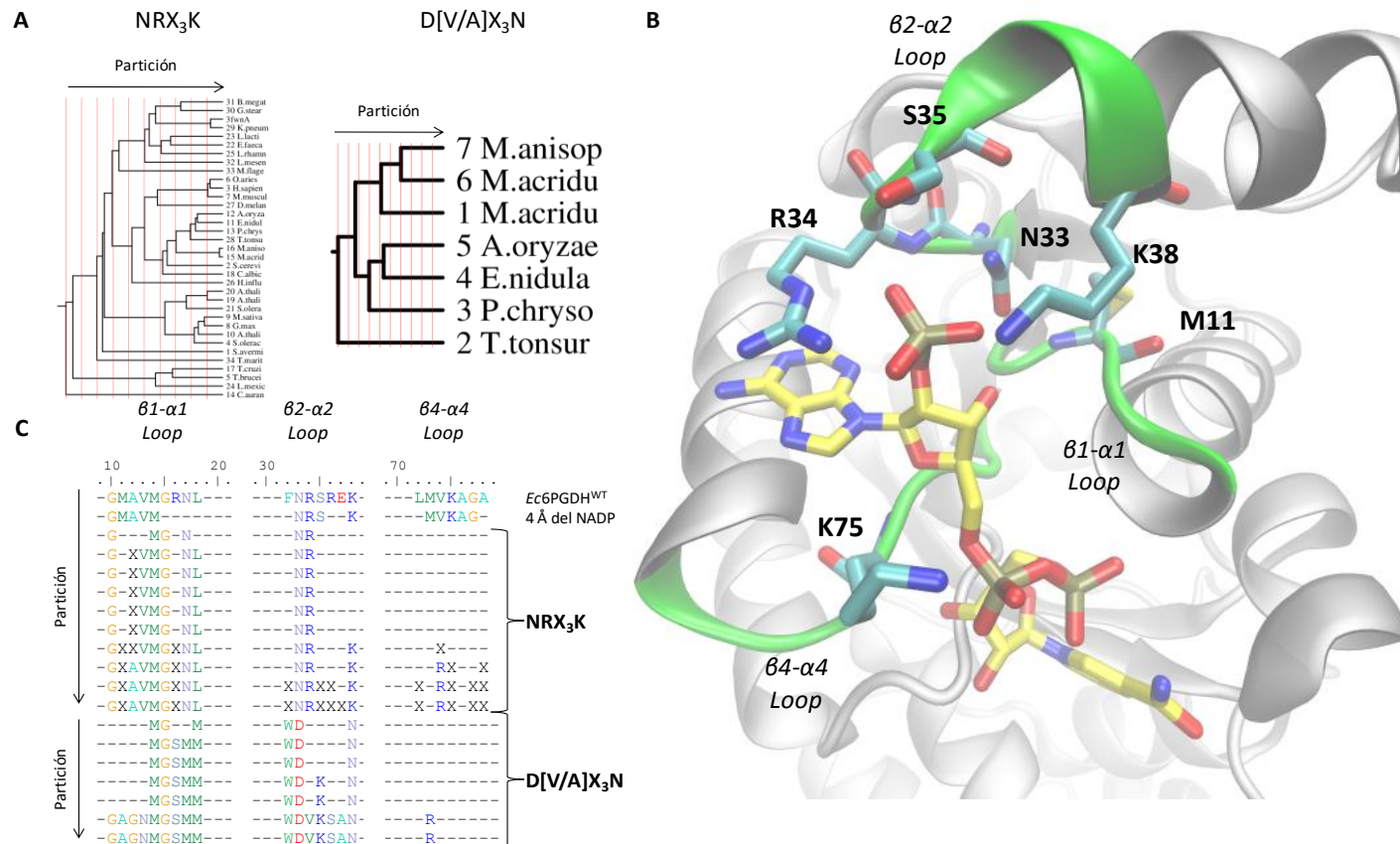


Figura 10. Análisis de residuos conservados en la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa. (A) Se muestran los árboles filogenéticos de ambos grupos con sus respectivas particiones (líneas verticales rojas). (B) Alineamiento de secuencias consenso de cada partición para ambos grupos. Se incluye la secuencia de *E. coli*, los residuos que se encuentran a una distancia de 4 Å del NADP (4Å) y los residuos seleccionados para la mutagénesis de saturación de sitios (selección). (C) Representación del sitio de unión a NADP de la *Ec6PGDH*. Se destacan en verde los loops cercanos al NADP (en amarillo) y los residuos seleccionados para mutagénesis.

2. Diseño racional de la 6PGDH de *Escherichia coli*

2.1. Generación de variantes de *Ec6PGDH*

Por medio de mutagénesis sitio-dirigida ya se había reemplazado el motivo NRSX₂K de *Ec6PGDH* silvestre por el motivo DVX₃A, que se encuentra en enzimas homólogas preferentes por NAD, particularmente en las 6PGDH homotetraméricas. En este trabajo se propuso el cambio hacia el motivo DVKX₂N presente en enzimas homólogas de hongos con dominio C-terminal repetido. La racional del diseño de las mutantes consistió primero en mutar la S35 por lisina, pues este residuo aparece conservado desde la 4 partición del grupo D[V/A]X₃N (**Figura 10**). El siguiente paso fue introducir el cambio A38 por asparragina, pues este residuo se encuentra completamente conservado en el grupo D[V/A]X₃N desde la primera partición.

Usando los procedimientos descritos en la sección 2.9 de Materiales y Métodos, se obtuvo las variantes N33D-R34V-S35K-K38A (DVKA) y N33D-R34V-S35K-A38N (DVKN) de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de *Escherichia coli*. Los plásmidos recombinantes fueron secuenciados por MacroGen™. En la **Figura 11** se muestran los resultados de secuenciación en los codones mutados.

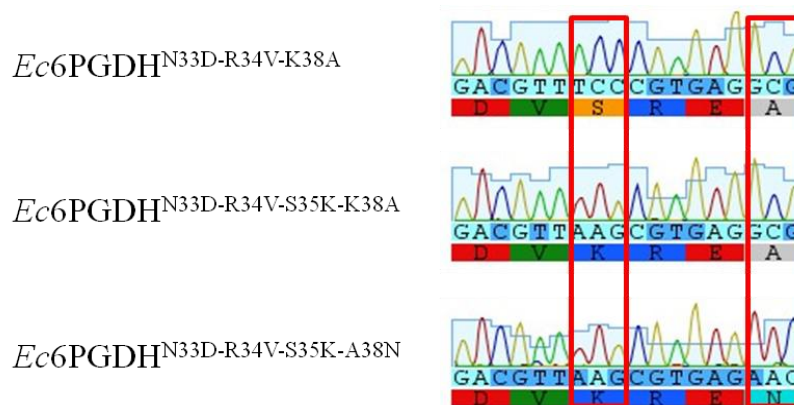


Figura 11. Secuenciación de las variantes de *Ec6PGDH*. Se muestran los electroforetoGRAMAS de secuenciación de cada mutante. En rectángulos rojos se resaltan las mutaciones realizadas en este trabajo.

2.2. Caracterización cinética de variantes del motivo NRSX₂K de la *Ec6PGDH*

Para cada mutante se realizaron mediciones de la actividad enzimática en presencia de NAD y NADP usando una concentración de 2 mM de 6PG, que se encuentra dentro del rango fisiológico de este metabolito en *E. coli* [Bennett y cols, 2009]. En ambos casos, hubo una fuerte caída de la actividad enzimática con NADP. Incluso, en algunos casos no se logró detectar actividad inclusive a altas concentraciones de este cofactor en cinéticas de 5 minutos con mayor cantidad de enzima. Las variantes muestran un incremento en la constante catalítica para NAD con respecto a la enzima silvestre. Además, existe una disminución significativa de la K_M para NAD en cada mutante (**Tabla 8**).

2.2.1. Variante DVKA

El reemplazo de la serina 35 por lisina llevó a que no se pudiera medir actividad con NADP (**Figura 12A**). Sin embargo, con respecto a NAD se observó tanto una disminución en la k_{cat} como en la K_M . Mientras que la k_{cat} disminuyó cerca de un 20%, la K_M disminuyó casi a la mitad. Esto conllevó a un aumento en la eficiencia catalítica de casi el doble con respecto a la variante predecesora N33D-R34V-K38A y un aumento de casi 6 veces respecto a la enzima silvestre. En esta variante no se pudo determinar el cociente de las constantes catalíticas de NADP versus NAD debido a que no se pudo determinar los parámetros cinéticos con NADP (**Tabla 8**).

2.2.2. Variante DVKN

El reemplazo de la alanina 38 por lisina tampoco permitió la medición de actividad con NADP (**Figura 13B**). No obstante, se observó un aumento en la k_{cat} de casi el doble, mientras que la K_M disminuyó a más de la mitad. Esto conllevó a un aumento en la eficiencia catalítica de 4 veces con respecto a la variante predecesora N33D-R34V-S35K-K38A y un aumento de casi 25 veces respecto a la enzima silvestre. En esta variante tampoco se pudo determinar el cociente de las constantes catalíticas de NADP

versus NAD debido a que no se pudo determinar los parámetros cinéticos con NADP (Tabla 8).

Tabla 8. Constantes cinéticas de las enzimas 6PGDH disponibles y generadas en el laboratorio.

	NADP			NAD			$[k_{cat}/K_M]^{NADP}$ $[k_{cat}/K_M]^{NAD}$
	K_M uM	k_{cat} s ⁻¹	k_{cat}/K_M s ⁻¹ /uM	K_M uM	k_{cat} s ⁻¹	k_{cat}/K_M s ⁻¹ /uM	
[#] <i>Ec</i> 6PGDH ^{WT}	17	41	2,4	30449	6,3	2,1 E -4	1654
[#] <i>Ec</i> 6PGDH ^{DVA}	7200	0,15	2,1 E-5	36700	24	6,5 E -4	0,03
<i>Ec</i> 6PGDH ^{DVKA}	-*	-*	-*	15576	19	1,2 E -3	
<i>Ec</i> 6PGDH ^{DVKN}	-*	-*	-*	6728	36	5,3 E -3	
[#] <i>Go</i> 6PGDH	496	41	0,083	86	44	0,51	0,16

*No se logró determinar actividad con NADP inclusive a 10 mM en tiempos de 5 minutos.

[#] Tesis de Magister de Maturana (2014).

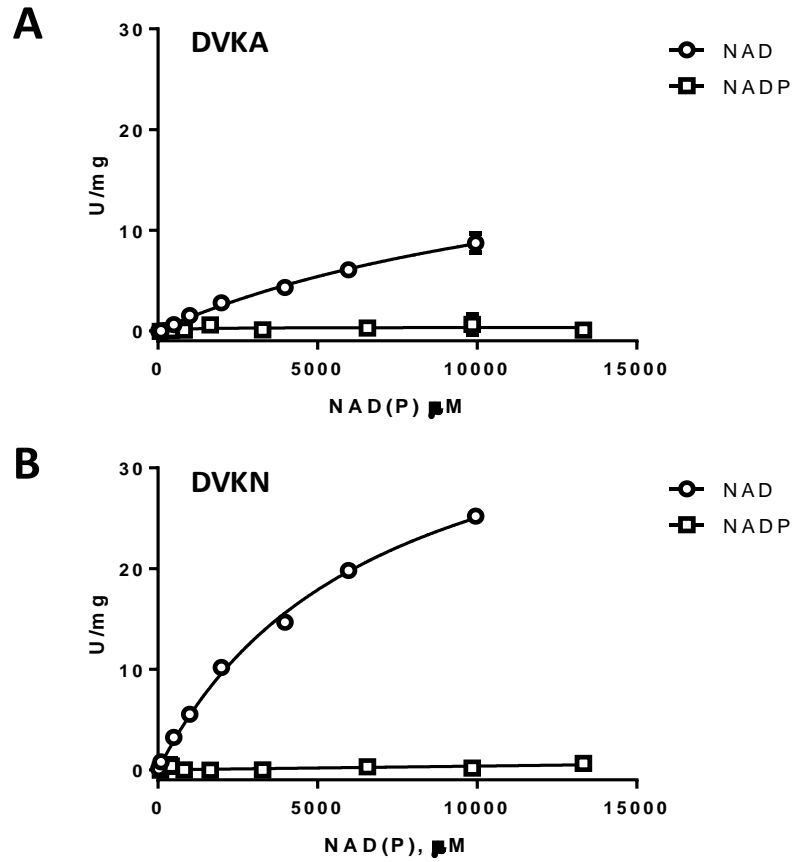


Figura 12. Comportamiento cinético de las variantes DVKA y DVKN de *Ec6PGDH*. Gráficos de actividad en condiciones de velocidad inicial para cada mutante en presencia de 2 mM de 6PG, para NAD y NADP. Resultados corresponden a 3 mediciones independientes.

A pesar del incremento en la eficiencia catalítica con NAD respecto de la enzima silvestre, se busca una enzima cuya K_M para NAD sea menor que su concentración fisiológica (~2 mM) [Bennett y cols, 2009]. Por lo tanto, se continuó con los residuos identificados por estudios de traza evolutiva para realizar mutagénesis de saturación de sitios.

3. Generación de cepa inviable en glucosa

El procedimiento de generación de cepas con deleciones cromosomales se describe en la sección Métodos 3.2. Previo a la etapa final, se obtuvieron cepas que presentaron resistencia a kanamicina como resultado de los procedimientos de mutagénesis. Éstas se transformaron con el plásmido pCP20 para la escisión del gen de resistencia al antibiótico, obteniéndose las cepas finales. En la **Tabla 5** se detallan las cepas generadas y las características que poseen. Todas fueron analizadas mediante PCR de colonias y posteriormente por la secuenciación de los fragmentos amplificados. En la **Figura 13A** se muestran los fragmentos amplificados según la modificación de cada cepa, las cuales coinciden con las masas moleculares esperadas (**Figura 13B**). En aquellas cepas que se les reemplazaron los genes *udhA* y *gnd*, se observó un aumento del tamaño del fragmento debido a la integración del *cassette* FRT-*kan*-FRT, mientras que en las cepas en las que se delecionó el operón *edd-eda* se observó una disminución del tamaño del fragmento debido a la integración del *cassette* FRT-*kan*-FRT en el lugar del operón. En las cepas tratadas para remover la resistencia, se observó una disminución del tamaño de los fragmentos provenientes de los *cassettes* integrados, debido a la escisión del gen *aph*. La cepa final conservó la resistencia a kanamicina, por lo que el genotipo final de la cepa mutante generada fue $\Delta pgi \Delta(edd-eda) \Delta udhA \Delta gnd::kan$. La secuenciación de los *loci* de las cepas coincidió con las modificaciones esperadas para cada locus (**Figura 13C**).

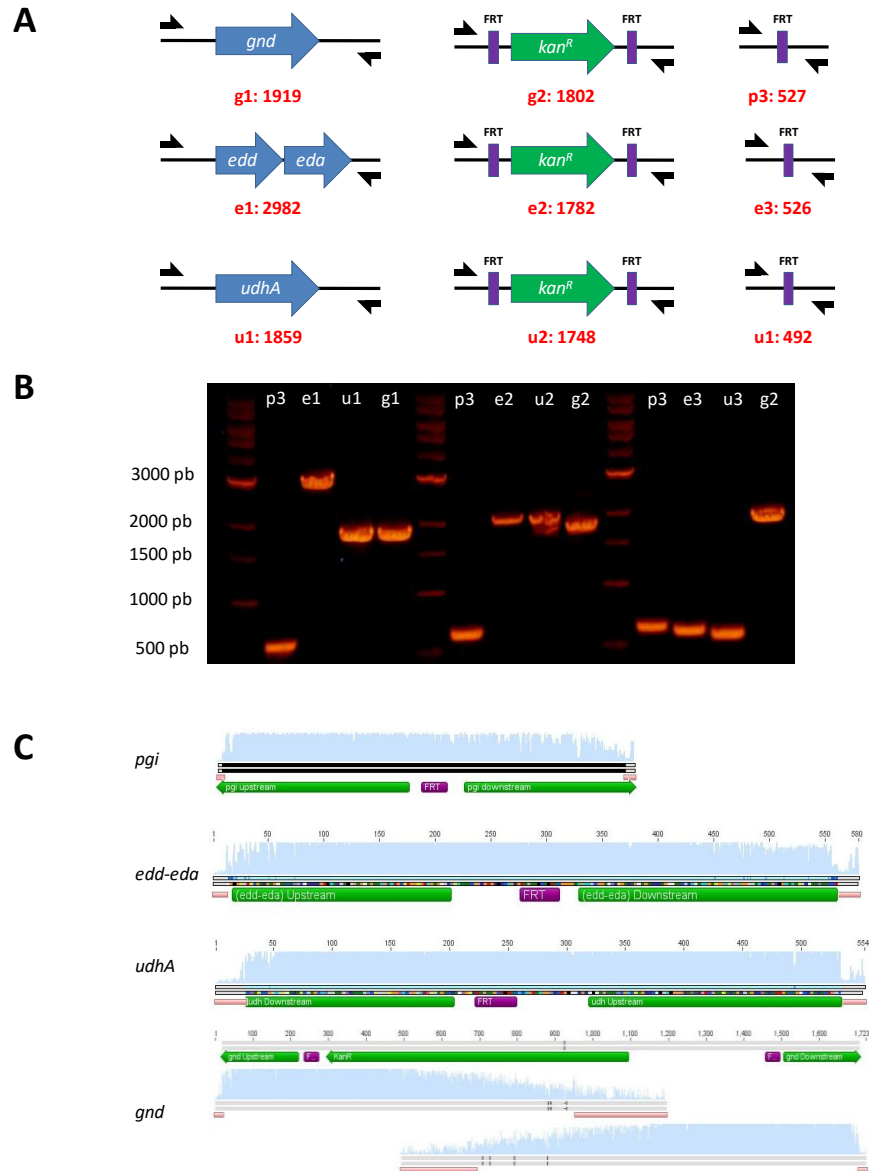


Figura 13. Verificación de cepas mutadas. (A) Se muestra los esquemas de las regiones *pgi* (p), *edd-eda* (e), *udhA* (u) y *gnd* (g), según la modificación que corresponda (1: gen silvestre, 2: Δ gen::*kan*, 3: Δ gen::*FRT*). Las flechas negras representan el posicionamiento de los partidores utilizados para la verificación de tamaños (Tabla 7). Bajo cada fragmento se indica su código con una letra (inicial del gen), un número y el tamaño esperado. (B) Gel obtenido de la electroforesis de los productos del PCR de colonias. Carriles 1, 6 y 11 son estándar de peso molecular. Luego, cada uno de los carriles corresponde al producto señalado en A. (C) Secuenciación de los loci. Se identifica la cicatriz *FRT* generada (morado) y las regiones río arriba y río abajo (verde).

Para evaluar la hipótesis que *el cambio de especificidad in vivo de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa de Escherichia coli desde NADP a NAD, permite una recuperación parcial en la tasa de crecimiento en una cepa como Δ pgi Δ udhA, incapaz de crecer en medio mínimo suplementado con glucosa*, se usaron como genes control las formas nativas de los genes *gnd* de *Gluconobacter oxydans* (6PGDH con preferencia dual por NADP y NAD) y *Escherichia coli* (6PGDH dependiente de NADP) y la mutante *Ec6PGDH^{DVKN}* (**Tabla 8**).

4. Evaluación del efecto del cambio de especificidad desde NADP a NAD de las variantes 6PGDH generadas en la cepa inviable en glucosa

4.1. Subclonamiento de variantes de genes de 6-fosfogluconato deshidrogenasa

Los genes *Ec6PGDH^{WT}*, *Ec6PGDH^{DVKN}* y *Go6PGDH*, inicialmente clonados en el plásmido pET-TEV, fueron subclonadas en el plásmido pTrc99a. Este último permite la expresión inducida por IPTG del gen clonado bajo el control del promotor *trc* en cepas que no poseen la polimerasa T7 en su genoma (necesaria para la expresión de genes en el plásmido pET). Este es el caso de la cepa de *E. coli* MG1655 con la cual trabajamos. Para el clonamiento, se realizó un PCR usando partidores que flanquean las zonas N y C terminal del marco de lectura del gen (incluyendo la región codificante para la cola de hexa-histidina y el sitio de corte de la proteasa TEV), en cuyos extremos 5' se encontraban las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI*. Una vez obtenidos los clones positivos, se envió 20 μ L de muestra de 50 ng/ μ L de ADN plasmidial a secuenciar a MacroGen USA utilizando los partidores pTrc99a_prom y pTrc99a_ter, para determinar el resultado del empalme y desechar la presencia de mutaciones secundarias. En la **Figura 14** se muestran las etapas de amplificación de los genes del vector original, subclonamiento en el vector intermediario pBluescript II, la digestión del plásmido y escisión de los fragmentos desde el vector de subclonamiento hasta la ligación en el vector pTrc99a.

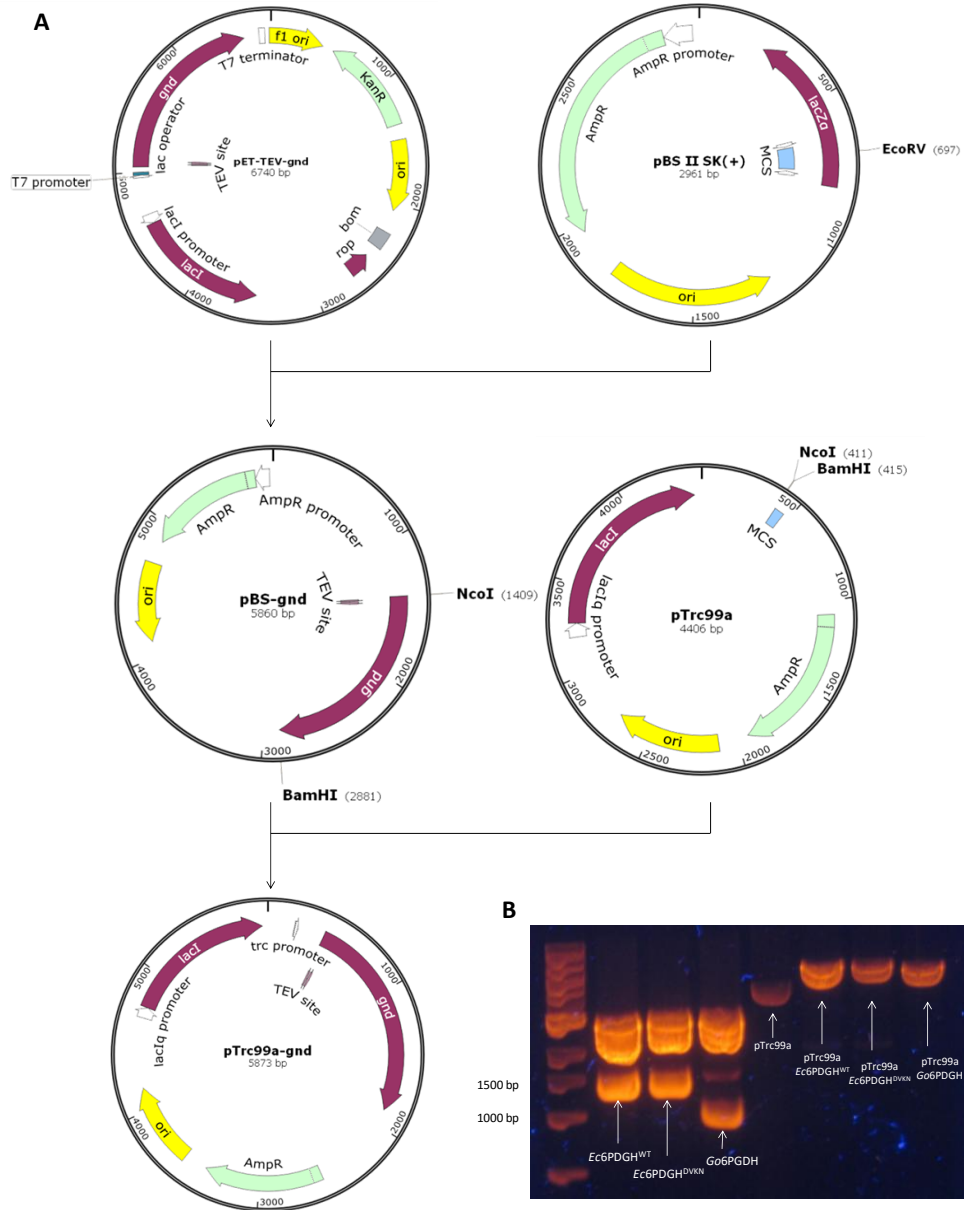


Figura 14. Subclonamiento de los genes $Ec6PGDH^{WT}$, $Ec6PGDH^{DVKN}$ y $Go6PGDH$. (A) Esquema de subclonamiento del gen *gnd* desde el vector pET al vector pTrc99a. (B) Electroforesis en gel de agarosa de muestras del subclonamiento. Carril 1: estándar de ADN 1 kb. Carril 2-4: pBluescript II con los insertos de *gnd* indicados digerido con las enzimas *NcoI* y *BamHI*. Carril 5: pTrc99a sin inserto digerido con *BamHI*. Carriles 5-8: pTrc99a con inserto digerido con *BamHI*.

4.2. Inducción de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa

La cepa mutante $\Delta pgi \Delta(edd-eda) \Delta udhA \Delta gnd::kan$ transformada con los plásmidos pTrc::*gnd*^{EcWT}, pTrc::*gnd*^{EcDVKN} o pTrc::*gnd*^{Gox} (denominadas como Δ^4 WT, Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox, respectivamente) se cultivó en LB suplementado con kanamicina y ampicilina hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Se agregó IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Se monitoreó la expresión de las enzimas mediante SDS-PAGE y actividad enzimática.

Adicionalmente, como control de actividad y expresión se trató de la misma manera a la cepa $\Delta pgi \Delta(edd-eda) \Delta udhA gnd^+$ para confirmar que la actividad específica de la enzima inducida en los extractos, utilizando NADP como cofactor, fuera superior a la actividad de la enzima expresada a partir de su promotor cromosomal. Así, se esperaba que existiera suficiente enzima al momento de cambiar de medio LB a medio mínimo M9. De esta manera, la velocidad de reacción de la 6PGDH no sería la reacción limitante, por lo que se podría asociar los fenómenos de crecimiento a la especificidad de la enzima y no a una baja expresión de ésta.

Se determinó que la actividad enzimática de las proteínas inducidas superaba hasta 30 veces la actividad de la enzima expresada a partir de su promotor cromosomal (**Figura 15A**). Este aumento en la actividad se correlaciona con el aumento en la cantidad de enzima producida luego de la inducción (**Figura 15B**). Considerando estos resultados, se decidió utilizar 4 horas como tiempo de inducción antes de cambiar de medio LB a M9-glucosa.

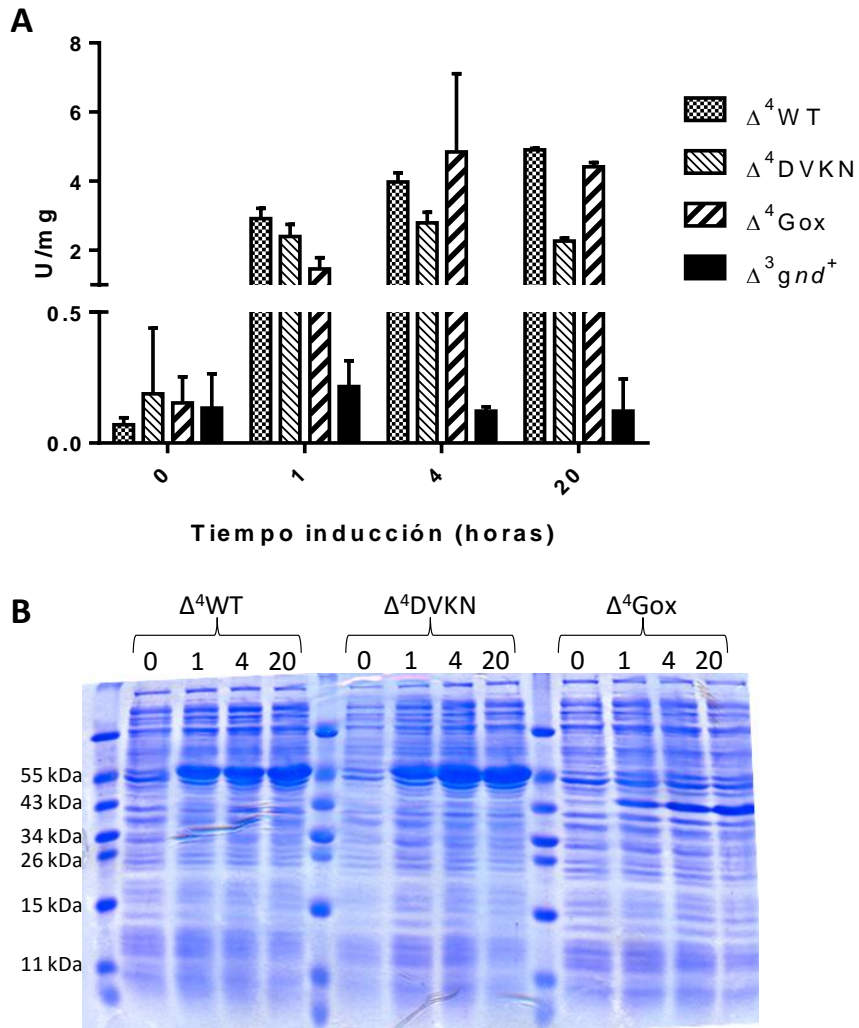


Figura 15. Expresión de 6PGDH del plásmido pTrc99a. (A) Actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en extractos de células a diferentes tiempos de inducción. (B) SDS-PAGE de lisados bacterianos luego de 0, 1, 4 y 20 horas de inducción con IPTG 1 mM. Carriles 2-5 *gnd-Ec6PGDH*^{WT}, carriles 7-10 *gnd-Ec6PGDH*^{DVKN} y carriles 12-15 *Go6PGDH*.

4.3. Caracterización fisiológica: tasa de crecimiento

Para evaluar el efecto del cambio de especificidad *in vivo* de la 6PGDH en la cepa generada, se determinó la velocidad de crecimiento de las cepas complementadas con las diferentes variantes de genes. Para esto, las cepas Δ^4 WT, Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox se cultivaron en LB y se indujo con IPTG 1 mM por 4 horas una vez que el cultivo había alcanzado una DO_{600} de 0,5. Luego, se subcultivó en medio M9 con glucosa 5g/L e IPTG 1 mM, para luego determinar la DO_{600} a diferentes tiempos (**Figura 16**). Se observó que las cepas Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox, que expresan 6PGDH dependientes de NAD, poseen una menor fase *lag* y crecen más rápido que la cepa Δ^4 WT, que expresa una 6PGDH dependiente de NADP. Se determinó la tasa de crecimiento para las cepas Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox, siendo éstas de $0,17 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ y $0,14 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Para confirmar que las células a las cuales se les midió la velocidad de crecimiento correspondían a las cepas Δ^4 y no a contaminaciones, se realizó PCR para identificar las cicatrices generadas por las deleciones de los diferentes genes. En todos los casos se identificó que las cepas estudiadas no eran contaminación (datos no mostrados).

Debido a la relación entre la velocidad de crecimiento de la cepa generada y la especificidad de la 6PGDH codificada en el gen con el cual se complemente, se planteó utilizar esta cepa como un sistema de selección para una librería de 6PGDH generada mediante mutagénesis de saturación de sitios, para obtener una variante 6PGDH con mayor especificidad por el cofactor NAD.

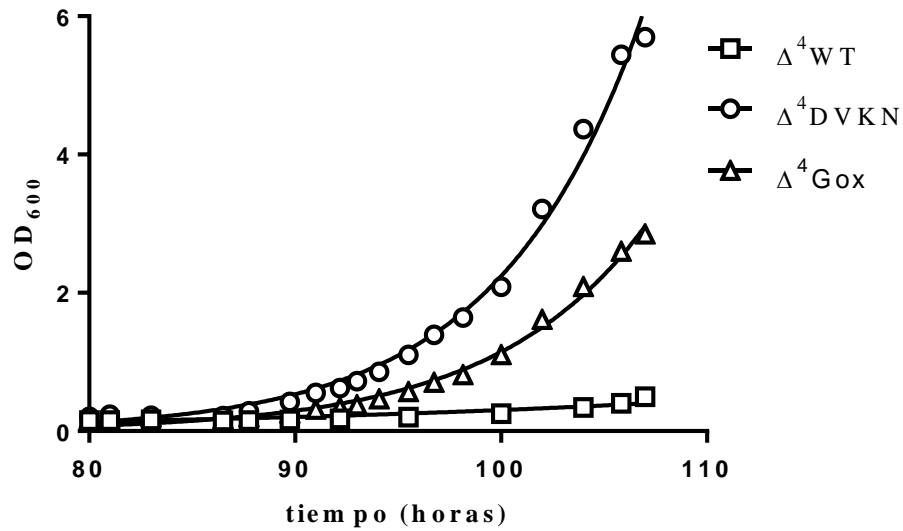


Figura 16. Curva de crecimiento de las cepas Δ^4 WT, Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox. Se muestran los valores obtenidos de DO_{600} de los cultivos de las 3 cepas. Las líneas que unen los puntos representa el ajuste exponencial de los datos.

5. Desarrollo del sistema de selección

5.1. Estandarización del sistema de selección

Con el objetivo de aislar clones positivos dentro de una librería de variantes de la enzima en estudio, el sistema de selección debe ser capaz de analizar el mayor número de variantes de manera rápida y eficiente. Dado que el sistema de selección está basado en la diferencia en la velocidad de crecimiento de las cepas, aquellas que tuvieran un plásmido que expresa una 6PGDH específica por NAD tendrían una mayor velocidad de crecimiento, por lo que podrían ser aisladas de aquellas cepas transformadas con plásmidos con genes codificantes de 6PGDH específicas por NADP. Se probaron dos alternativas para la selección de clones utilizando las cepas Δ^4 WT, Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox como controles, como se describe a continuación.

5.2.1. Enriquecimiento de cultivo

Una alternativa para seleccionar clones de manera masiva es el enriquecimiento de cultivo, donde se obtiene el clon con mayor velocidad de crecimiento mediante subcultivos. Para poder analizar si un enriquecimiento de cultivo puede ser implementado, se realizó una competencia entre las cepas control.

Para evaluar cómo varía la población dentro del cultivo, se amplificaron los genes *gnd* de los plásmidos transformados mediante PCR (sección Métodos 3.2.4). El protocolo varió con la utilización de los 3 distintos partidores para el subclonamiento, de los cuales uno es idéntico para la región 5' de los genes, mientras que la región 3' es distinta para el gen *gnd* de *G. oxydans* y para los genes *gnd* de *E. coli*. Además, como templado para la reacción, se utilizó 2 μL de la mezcla obtenida al resuspender 1 mL en 50 μL del cultivo en competencia después de centrifugar 1 minuto a máxima velocidad en una centrífuga de mesa.

Se realizaron las competencias entre las cepas $\Delta^4\text{WT}$ y $\Delta^4\text{Gox}$ y entre las cepas $\Delta^4\text{DVKN}$ y $\Delta^4\text{Gox}$. No se realizó la competencia entre las cepas $\Delta^4\text{WT}$ y $\Delta^4\text{DVKN}$ debido a que el producto de PCR que generan ambos es del mismo tamaño, puesto que la variante *Ec6PGDH*^{DVKN} se generó a partir de *Ec6PGDH*^{WT}, por lo que sus diferencias en 4 posiciones no pueden observarse mediante PCR con los partidores mencionados. Para realizar las competencias, primero se cultivó por separado las cepas $\Delta^4\text{WT}$, $\Delta^4\text{DVKN}$ y $\Delta^4\text{Gox}$ en LB, induciendo con IPTG 1 mM cuando la DO₆₀₀ alcanzó un valor cercano a 0,5. Luego de 4 horas de inducción, se midió DO₆₀₀ y se cultivó en medio mínimo M9 suplementado con glucosa e IPTG, una mezcla 10:1 de las cepas $\Delta^4\text{WT}$ y $\Delta^4\text{Gox}$ y una mezcla 1:1 de las cepas $\Delta^4\text{DVKN}$ y $\Delta^4\text{Gox}$. Se realizó un cultivo durante 72 horas y luego se realizaron subcultivos cada 24 horas, partiendo de una DO₆₀₀ cercana a 0,1, y tomando una alícuota en el comienzo de cada subcultivo para realizar el seguimiento de la población mediante PCR.

Se encontró que en la competencia Δ^4 WT *versus* Δ^4 Gox, esta última no genera un producto de PCR observable mediante electroforesis en gel de agarosa luego del 4 subcultivo (**Figura 17**), por lo que suponemos que la cepa Δ^4 WT desaparece del cultivo a pesar de comenzar 10 veces más concentrada que Δ^4 Gox.

En el caso de la competencia Δ^4 DVKN *versus* Δ^4 Gox, no se observaron diferencias significativas a lo largo de los subcultivos (**Figura 17**).

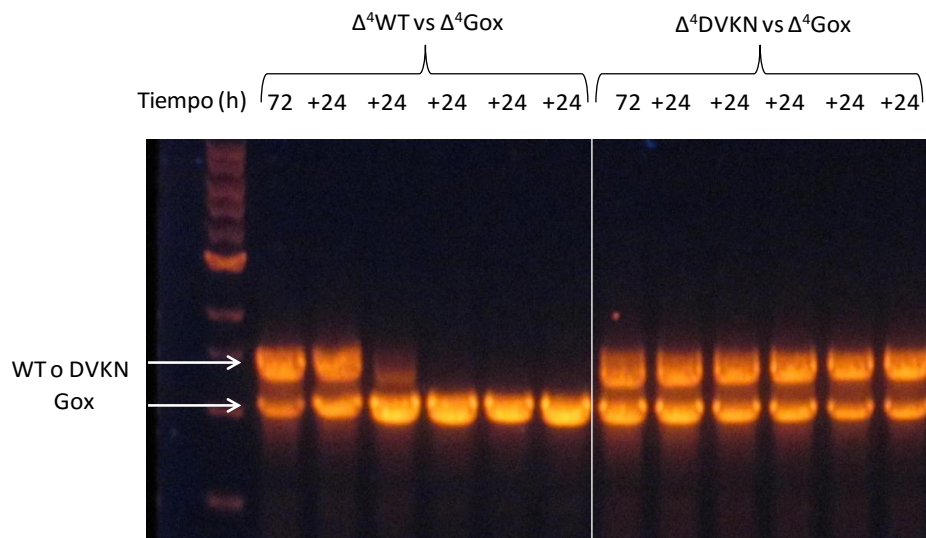


Figura 17. Enriquecimiento de cultivo en competencia. Se muestran los productos de PCR obtenidos a partir de muestras tomadas al comienzo de cada subcultivos y el tiempo transcurrido entre cada subcultivo.

A pesar que el enriquecimiento de cultivo permite la selección de la cepa deseada, se encontró un problema al trabajar con este protocolo. Se observó que las cepas luego de ser cultivadas en medio mínimo, la expresión de la enzima es afectada. Con respecto a los cultivos en LB de las cepas Δ^4 WT, Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox, se observó tanto actividad (**Figura 18A**) como expresión de la enzima corroborada por SDS-PAGE (**Figura 18B**). Sin embargo, de las cepas que crecieron en M9, Δ^4 DVKN muestra una menor actividad pero se observa expresión, mientras que Δ^4 Gox disminuye en ambos parámetros. De estos cultivos que crecieron, se realizaron aislamientos en agar LB y luego algunas colonias individuales

fueron cultivadas en LB y se indujo la expresión de proteínas. Se observó que la expresión no alcanza los valores originales si es que la cepa ha sido cultivada en M9.

Para probar qué factores podrían estar relacionados con la disminución en la expresión de las proteínas en estudio, se buscó el efecto que tiene la glucosa sobre la inducción. Debido a que la inducción es generada por un análogo de lactosa, la expresión podría ser inhibida debido a la presencia de glucosa en el medio. Para probar esto, se indujo la expresión de proteínas en medio LB suplementado con IPTG 1 mM y glucosa 5 g/L en las cepas Δ^4 WT, Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox. La adición de glucosa al medio no disminuyó la expresión de proteína en ninguna de las cepas (**Figura 19**).

5.2.2. Selección en placa

Se probó un sistema de selección de clones positivos a través de selección en placa. Las cepas Δ^4 WT, Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox fueron sembradas en agar M9 suplementado con glucosa e IPTG y también en LB sólido. No se observó crecimiento de colonias en medio mínimo luego de 4 días, pero sí en agar LB luego de 1 día. Tampoco se observó el crecimiento en agar M9 suplementado con glucosa e IPTG de las cepas Δ^4 WT, Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox previamente sembradas en agar LB suplementado con IPTG.

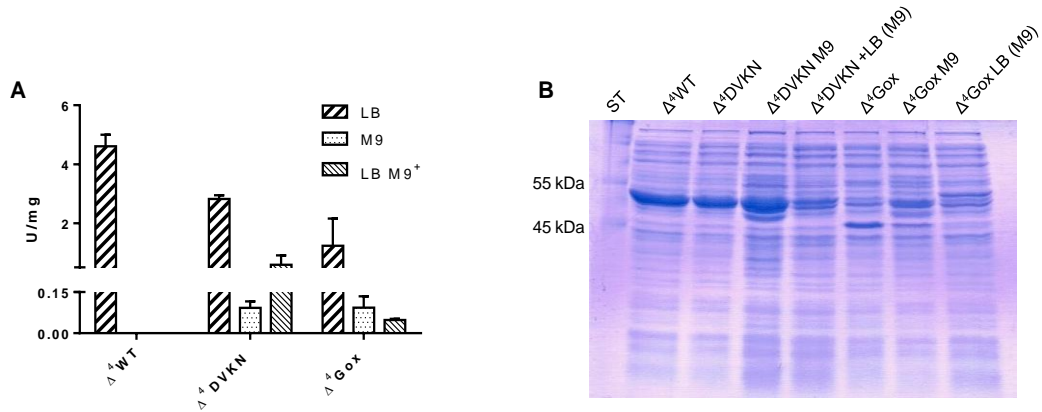


Figura 18. Efecto del cultivo en medio mínimo sobre la expresión de proteínas. (A) Se muestra la actividad enzimática de lisados de las cepas Δ^4 WT, Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox al ser cultivadas en LB (LB), medio mínimo (M9) y en LB luego de haber sido cultivadas en medio mínimo (LB M9⁺). (B) SDS-PAGE de las muestras en (A).

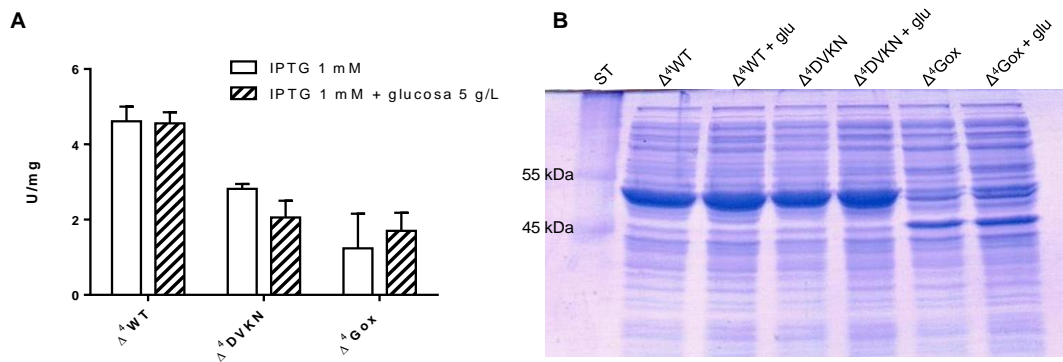


Figura 19. Efecto de glucosa en la expresión de 6-fosfogluconato deshidrogenasa en medio LB. (A) Se muestra la actividad enzimática de extracto medido con 6PG y NAD ambos a 2 mM en la reacción. Se realizó la inducción con IPTG 1 mM durante 4 horas en medio LB en presencia o ausencia de glucosa 5 g/L. (B) SDS-PAGE de los extractos celulares en (A).

5.2. Mutagénesis de saturación de sitios

La mutagénesis de saturación de sitios se realizó utilizando como primer templado el plásmido pTrc99a::*gnd*(*Ec6PGDH*^{DVKN}). Para la mutagénesis se utilizaron los partidores con degeneración NNK (**Tabla 7**). Se digirió con *DpnI* el producto de PCR y luego fue electroporado en células DH5 α . Como control, se utilizó una mezcla de reacción que no contenía partidores, la cual también fue digerida con *DpnI* y electroporada en células DH5 α . Se obtuvieron cientos de colonias en las saturaciones de las posiciones M11, V34K35 y K75, mientras que en el control negativo no se observaron colonias.

Se tomaron 4 colonias de cada librería y se cultivaron en LB suplementado con ampicilina. Un total de 12 plásmidos fueron purificados y enviados a secuenciar a Macrogen. Además, se envió el producto de PCR obtenido a partir de cada reacción de mutagénesis.

En las mutagénesis de saturación en las posiciones 11 y 75, se observó que los clones secuenciados presentan un residuo diferente al original. Además, el producto de PCR representativo de la librería presenta una disminución en la calidad de la secuenciación, indicando que existe una degeneración en esa zona (**Figura 20**).

En la mutagénesis de saturación en el sitio V34-K35, se observó que los clones secuenciados presentan la misma secuencia que la original. Sin embargo, el producto de PCR representativo de la librería presenta una disminución en la calidad de la secuenciación en ambos codones, sugiriendo que existe una degeneración en esa zona (**Figura 20**).

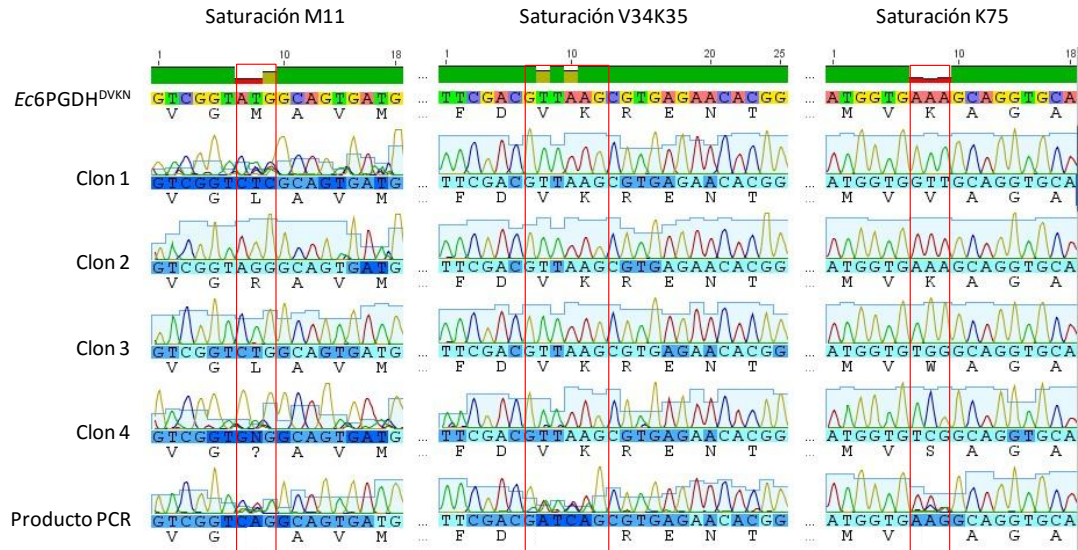


Figura 20. Secuenciación de clones generados mediante mutagénesis de saturación de sitios. Se muestran las regiones correspondientes a los sitios de interés de 4 clones por librería y el producto de PCR. En un cuadro rojo se destacan los codones a saturar.

DISCUSIÓN

1. Estudios de traza evolutiva

A pesar que en la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa se pueden identificar 4 grupos, nos enfocamos en aquellas enzimas homodiméricas que poseen un motivo de secuencia diferente en el *loop* β 2- α 2. El estudio de los residuos conservados en ambos grupos mostró que las diferencias entre los grupos utilizados se encontraban principalmente en la región que forma el sitio de unión a dinucleótido en la proteína. En otras regiones, como el sitio de unión a 6-fosfogluconato, no se encontraron diferencias entre los grupos y ambos conservan el motivo catalítico KMXHNXXE, descrito anteriormente [Maturana, 2014].

En este trabajo se comparó con el grupo más cercano a la enzima a modificar, es decir, 6-fosfogluconato deshidrogenasas con el dominio C-terminal duplicado que pertenecen a hongos. No obstante, este grupo ahora identificado como DVKX₂N posee sólo 7 secuencias disponibles en bases de datos, mientras que el grupo NRX₃K posee 36. Esto supone un problema que podría ser resuelto buscando más secuencias para el grupo con menos secuencias. Además, podrían también analizarse mediante estudios de traza evolutiva las enzimas con estados oligomérico distintos, las cuales fueron descartadas del análisis en este trabajo, dentro de ellas la enzima de *Gluconobacter oxydans*. La inclusión de otros grupos dentro de la superfamilia 6-fosfogluconato deshidrogenasa podría ayudar a identificar otras posiciones para mutagenizar.

2. Efecto de las mutaciones en el motivo NRX₃K en *Ec6PGDH* en la preferencia por dinucleótido

Las dos variantes generadas en este trabajo, *Ec6PGDH*^{DVKA} y *Ec6PGDH*^{DVKN}, poseen una actividad enzimática tan baja con el cofactor NADP que no fue posible determinar sus parámetros cinéticos, incluso a altas concentraciones de dinucleótido en curvas de tiempo largas. Esto supone que, con respecto a la variante predecesora *Ec6PGDH*^{DVA}, en las

nuevas mutantes se eliminaron por completo las interacciones que estabilizan la unión del fosfato 2' presente en el NADP.

El reemplazo de la serina 35 por lisina resulta tanto la inclusión de una carga positiva como de una cadena lateral más larga. Mientras que el primer factor pudiera estabilizar tanto el fosfato 2' del NADP, la extensión de la cadena lateral llevaría a un impedimento estérico con el grupo fosfato y no así con el hidroxilo del NAD, con el cual puede establecer interacciones polares. Probablemente, el reemplazo de la alanina 38 por asparragina no mostró actividad con NADP por la misma razón que la variante anterior. Sin embargo, el único efecto de esta mutación estaría en la disminución de la K_M por NAD.

3. Fenotipo de la cepa inviable en glucosa

La generación de la cepa de *E. coli* MG1655 $\Delta pgi \Delta(edd-eda) \Delta udhA \Delta gnd::kan$, denominada Δ^4 , no ha sido reportada, por lo que sus parámetros fisiológicos son desconocidos. Anteriormente, se describió que una cepa relacionada MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA$ es incapaz de sobrevivir en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono [Sauer y cols, 2004]. Como era de suponer, la generación de una cepa con deleciones en los *loci* propuestos en este trabajo no debiera permitir el crecimiento en medio mínimo, pero se desconocía la viabilidad de esta cepa en medio LB. Debido a que la principal fuente de carbono en el medio LB son los aminoácidos [Sezonov y cols, 2007], el ingreso de cuerpos carbonados al metabolismo es a través del ciclo de Krebs, por lo que no debiera ocurrir una sobreproducción de NADPH cuando la cepa Δ^4 crece en este medio. Esta sería la razón por la cual la cepa Δ^4 no presenta una disminución en su velocidad de crecimiento al ser cultivadas en medio LB. La idea que un exceso de NADPH es deletéreo para el crecimiento bacteriano se refuerza al demostrar que la cepa MG1655 $\Delta pgi \Delta(edd-eda) \Delta udhA \Delta gnd::kan$ no es capaz de crecer en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, a menos que se complemente la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa específica por NADH.

La cepa generada podría presentar además una fuerte selección debido al exceso de NADPH generado, llevando a la posibilidad que mutantes en otros sitios del genoma puedan aparecer. Por ejemplo, se ha descrito que en una mutante $\Delta pgi \Delta(edd-eda) \Delta udhA \Delta qor$ (*qor*: quinona oxidoreductasa), la sobreproducción de NADPH puede ser compensada a través de una mutación en el gen que codifica la proteína NuoF, enzima de la cadena transportadora de electrones. Esto permite a la bacteria consumir tanto NADH como NADPH para la respiración [Auriol y cols, 2011]. Aliviar el exceso de NADPH le significa al organismo recuperar parcialmente su tasa de crecimiento. A pesar que el sistema generado en esta tesis posee 3 de las 4 deleciones generadas en el estudio mencionado [Auriol y cols, 2011], la presencia del gen *qor* permite la correcta expresión de la NADPH-quinona oxidoreductasa, la cual estaría implicada en la eliminación de especies reactivas de oxígeno [Chang y cols, 2002], disminuyendo el potencial de generar mutaciones en el genoma. En el trabajo de Auriol no se menciona si la deleción de *qor* se realiza para incrementar la frecuencia mutagénica en el genoma, o para eliminar un punto en el metabolismo que podría oxidar NADPH, disminuyendo la sobreproducción del mismo.

En este trabajo, se intentó reiteradamente secuenciar el gen *nuoF*. Sin embargo, todos los intentos fracasaron, por lo que no podemos descartar que la mutación esté presente en las cepas luego de cultivar en el medio de selección. De generarse esta mutación, podría explicarse que la cepa Δ^4 complementada con la *Ec6PGDH*^{WT} presente un pequeño aumento en la DO₆₀₀ en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono luego de 100 horas.

Por otra parte, la tasa de crecimiento depende de la cantidad de sustrato que disponga la célula. En este trabajo se utilizó glucosa como única fuente de carbono en una cepa con un flujo desviado linealmente hacia la formación de ribulosa 5-fosfato. En esta cepa, la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa determina la cantidad de ribulosa 5-fosfato que se produce en la célula, por lo que sería la reacción limitante para el crecimiento.

Puesto que la velocidad de una reacción depende de los parámetros cinéticos de la enzima y de la concentración del sustrato, dos enzimas con k_{cat} similares pero K_M diferentes debieran recuperar parcialmente la velocidad de crecimiento, siendo mayor el efecto para la enzima cuya K_M está por debajo de la concentración celular del sustrato. Sin embargo, a pesar que la enzima *Go6PGDH* posee una K_M para NAD menor que las variantes *Ec6PGDH* y una k_{cat} similar entre las variantes, no genera en la cepa una velocidad de crecimiento mayor. Al utilizar *Escherichia coli* como sistema de expresión, la enzima *Go6PGDH* no tiene una optimización del uso codogénico, por lo que su expresión es menor. Ya se había observado este fenómeno durante la purificación de esta enzima, donde la inducción de la enzima se realiza a 20°C durante cerca de 20 horas, mientras que la inducción de *Ec6PGDH* se realiza a 37°C durante 4 horas. Esta diferencia en la expresión (ver **Figura 15**) explica que no exista una correlación entre la velocidad de crecimiento entre las cepas Δ^4 DVKN y Δ^4 Gox y la afinidad de las enzimas por NAD.

4. Expresión con IPTG en el sistema pTrc99a

Las variantes de genes *gnd* estaban originalmente clonados en un vector pET, el cual requiere la presencia de la polimerasa del fago T7 en la bacteria receptora para expresar las proteínas recombinantes, como es el caso de la cepa *E. coli* BL21(DE3). Sin embargo, en este trabajo se utilizó el vector de expresión pTrc99a debido a que este vector permite expresar proteínas independiente de la cepa que se utilice.

En la cepa Δ^4 , la expresión de proteínas a partir de genes clonados en este vector funciona sin problemas al trabajar en medio líquido LB. Sin embargo, se determinó que la expresión de estas proteínas era afectada al cultivar en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono e IPTG. Debido a la disminución en la expresión de proteínas, no se pudo medir actividad enzimática 6PGDH posterior al cultivo en medio mínimo. Además, una baja expresión de la enzima eventualmente determinará una baja velocidad de crecimiento que no se debe a la preferencia de la enzima por el cofactor.

El vector de expresión pTrc posee un promotor que corresponde a una fusión entre las regiones -35 del promotor *tac* y la región -10 del promotor *lac*. Esto implica que no es afectado por represión catabólica debido a que el sitio de unión para el regulador CAP (*cAMP Activator Protein*) no se encuentra presente [Balzer y cols, 2013]. Consecuentemente, al evaluar la adición de glucosa al medio LB no se observó efecto alguno en la expresión de la 6PGDH inducida por IPTG. Aunque estamos trabajando con un vector modificado, no logramos entender por qué la expresión de las proteínas recombinantes en estudio se pierde al cultivar la cepa Δ^4 en medio mínimo con glucosa.

5. Sistema de selección

Se observó que la cepa Δ^4 generada es capaz de discriminar entre aquellas enzimas 6PDGH con especificidad por NAD y aquellas con especificidad por NADP. A pesar de utilizar como control una enzima de un organismo diferente (*Go6PDGH*), se observó una diferencia notable en la velocidad de crecimiento con respecto a la enzima nativa de *E. coli* (*Ec6PDGH^{WT}*). No obstante, no se logró discriminar entre las cepas complementadas con las enzimas *Go6PDGH* y *Ec6PDGH^{D^{VKN}}*. Como se mencionó, la comparación entre estas cepas está dificultada por los diferentes niveles de expresión que presentan ambas enzimas en la cepa Δ^4 .

Como principal problema con el protocolo utilizado está la inestabilidad de la expresión de proteínas al cultivar en el medio de selección. A pesar que la cepa Δ^4 puede ser usada para seleccionar clones complementados con enzimas 6PDGH específicas por NAD, no nos permite la medición de actividad posterior a la selección, por lo que el protocolo utilizado debe ser optimizado. Para esto, existen alternativas como variar la cantidad de IPTG que se utiliza en el medio LB así como en el medio de selección. Por otra parte, si la pérdida en la expresión de proteínas sucede por una mutación en el cromosoma de la cepa, los plásmidos pueden ser purificados y analizados en una cepa Δ^4 que no haya pasado por medio de selección. Si la mutación ocurre en el promotor del vector, entonces podrían subclonarse

los genes a un vector que no haya sido modificado. También está la posibilidad de analizar cada una de las colonias transformantes en microplacas de 96 pocillos en lugar de tratar de seleccionar clones que posean la actividad que se está buscando.

6. Generación de librería

Para la generación de la librería de saturación de sitios se utilizaron partidores que incluían codones degenerados NNK en el sitio a saturar (**Tabla 7**). Como método de generación de variantes se utilizó un PCR de plásmido completo, utilizando dos partidores complementarios entre sí. Además, se tuvo en cuenta que los extremos 5' y 3' del codon mutagénico tuvieran una T_m similar entre ellos y cercana a 55°C.

Como parte final de la mutagénesis, es necesario que los *nicks* del producto de PCR, generados en el sitio donde hibrida el partidor utilizado, sean reparados por la bacteria receptora. Se eligió llevar a cabo este paso en la cepa DH5 α en lugar de la cepa Δ^4 , cuya inestabilidad metabólica pudiera impedir de alguna manera este proceso.

Para el caso de las saturaciones en las posiciones 11 y 75, cuya degeneración NNK permite la introducción de al menos uno de 32 codones posibles, se requiere analizar cerca de 100 colonias para observar al menos una vez cada uno de los 32 clones [Reetz y cols, 2008]. Dado que como producto de la transformación se obtuvieron cientos de colonias, se debería haber obtenido la complejidad teórica de la librería. Esto se sustenta al encontrar clones diferentes en las secuenciaciones.

Existe una situación diferente para el sitio de saturación 34-35. Puesto que el partidor utilizado contiene dos codones degenerados NNK (**Tabla 7**), existe un total de 32² combinaciones diferentes de codones (1024 variantes totales), por lo que se espera cubrir la totalidad de la librería al analizar cerca de 3000 clones [Reetz y cols, 2008]. Dado que como producto de la transformación se encontraron sólo cientos de colonias, no se tendría la totalidad de la complejidad teórica esperada para la librería y por lo tanto, sería menos

probable encontrar dos secuencias iguales entre sí. Sin embargo, sólo se encontró la secuencia templado en los plásmidos secuenciados. No obstante, existe una caída en la calidad de la secuenciación del producto de PCR en la zona a saturar (**Figura 20**). Aun así, no podemos asegurar que el producto de PCR posea una mezcla de secuencias. Un punto interesante a destacar es que la secuenciación del producto de PCR muestra una clara identificación de las dos guaninas que se encuentran al comienzo y al final del par de codones a saturar, lo que podría indicar que la interacción G-C impide de alguna manera la degeneración en esa zona a la temperatura de alineación utilizada.

En este trabajo se logró generar una cepa $\Delta pgi \Delta udhA \Delta(edd-eda) \Delta gnd$, incapaz de crecer en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono. En estas condiciones, al ser complementada con un gen codificante para una 6PGDH que presenta especificidad por NAD logró recuperar parcialmente su tasa de crecimiento. A pesar que el protocolo utilizado no permite la medición de actividad enzimática en extractos bacterianos luego de cultivar en el medio de selección, el sistema planteado sí es capaz de seleccionar aquellas cepas con mayor velocidad de crecimiento. Así, una futura optimización el protocolo permitirá seleccionar clones de una librería de variantes de la enzima 6PGDH. Con todo esto, el conocimiento de la relación entre la velocidad de crecimiento y la especificidad de una enzima por cofactor puede ser utilizado para propósitos biotecnológicos.

CONCLUSIONES

- Los estudios de traza evolutiva permiten la identificación de residuos relacionados con la especificidad por el cofactor NAD(P) en la familia de enzimas 6PGDH.
- Con la generación de la variante *Ec6PGDH* N33D-R34V-S35K-K38N se consiguió el cambio de especificidad desde NADP a NAD. Sin embargo, la variante aún posee una K_M por sobre la concentración fisiológica de NAD.
- La cepa MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta(edd-eda)::FRT \Delta udhA::FRT \Delta gnd::kan$ es incapaz de sobrevivir en medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono, a menos que sea complementada con un plásmido que codifique una 6PGDH NAD-específica. Esto establece una relación entre la velocidad de crecimiento, la especificidad de las enzimas de las vías centrales del metabolismo, y el balance de NADPH/NADH.
- Si bien la cepa diseñada permite la selección de plásmidos que codifique una 6PGDH NAD-específica por enriquecimiento de cultivo, aún necesita una optimización del protocolo para establecerse como un sistema de selección robusto para realizar experimentos de evolución dirigida.

REFERENCIAS

- Adachi, O. y M. Ameyama** (1982). “6-Phospho-d-gluconate dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans*”. *Methods in Enzymology*, Academix Press 89: 291-295.
- Arnold, F. H., Wintrode, P. L., Miyazaki, K., & Gershenson, A.** (2001). How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends in biochemical sciences*, 26(2), 100-106.
- Auriol, C., Bestel-Corre, G., Claude, J. B., Soucaille, P., & Meynial-Salles, I.** (2011). Stress-induced evolution of *Escherichia coli* points to original concepts in respiratory cofactor selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4), 1278-1283.
- Balzer, S., Kucharova, V., Megerle, J., Lale, R., Brautaset, T., & Valla, S.** (2013). A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 12, 26.
- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J., & Rabinowitz, J. D.** (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nature chemical biology*, 5(8), 593-599.
- Carugo, O. y Argos, P.** (1997). NADP-Dependent Enzymes. I: Conserved Stereochemistry of Cofactor Binding. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 28:10–28.
- Chang, D. E., Smalley, D. J., & Conway, T.** (2002). Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Molecular microbiology*, 45(2), 289-306.
- Chen, Y. Y., Ko, T. P., Chen, W. H., Lo, L. P., Lin, C. H., & Wang, A. H. J.** (2010). Conformational changes associated with cofactor/substrate binding of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Implications for enzyme mechanism. *Journal of structural biology*, 169(1), 25-35.
- Cornish-Bowden A.** (1995). Fundamentals of enzyme kinetics. p.240. Portland Press, London.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640-6645.

- Di Nola, A., Roccatano, D., & Berendsen, H. J.** (1994). Molecular dynamics simulation of the docking of substrates to proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 19(3), 174-182.
- Fuhrer, T. y Sauer, U.** (2009). Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *Journal of Bacteriology* 191: 2112-2121.
- Holms, W.H.** (1986). Evolution of the glyoxylate bypass in *Escherichia coli* – an hypothesis which suggests an alternative to the Krebs cycle. *FEMS Microbiology Letters* 34: 123–127.
- Maturana, P.** (2014). Evolución de los determinantes estructurales de la especificidad de sustratos en la familia 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Tesis de Magister. Universidad de Chile.
- Nelson, D.L., Cox, M.M.** (2006). Lehninger Principles of Biochemistry 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company. Cap. 13, page 512-513.
- Olavarria, K., De Ingeniis, J., Zielinski, D.C., Fuentealba, M., Muñoz, R., McCloskey, D., Feist, A.M. y Cabrera, R.** (2014). Metabolic impact of an NADH-producing glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Microbiology* 160: 2780-2793.
- Orth, J.D., Conrad, T.M., Na, J., Lerman, J.A., Nam, H., Feist, A.M. y Palsson, B.O.** (2011). A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. *Molecular Systems Biology* 7: 535-543.
- Rao, S. T. and M. G. Rossmann.** (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *J Mol Biol* 76(2): 241-256.
- Rellos, P., & Scopes, R. K.** (1994). Polymerase chain reaction-based random mutagenesis: production and characterization of thermostable mutants of *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase-2. *Protein expression and purification*, 5(3), 270-277.
- Reetz, M. T., Kahakeaw, D., & Lohmer, R.** (2008). Addressing the numbers problem in directed evolution. *ChemBioChem*, 9(11), 1797-1804.
- Salazar, O., & Sun, L.** (2003). Evaluating a screen and analysis of mutant libraries. In *Directed enzyme evolution* (pp. 85-97). Humana Press.

Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A. y Fischer, E. (2004). The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 6613-6619.

Schlegel, H. G., & Jannasch, H. W. (1967). Enrichment cultures. *Annual Reviews in Microbiology*, 21(1), 49-70.

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8746-8749.