



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA
MOLECULAR**

**Caracterización bioquímica y estructural de un
homólogo de XanA de *Aspergillus nidulans***

Tesis que presenta

Fitzya Yasen Bocanegra Jiménez

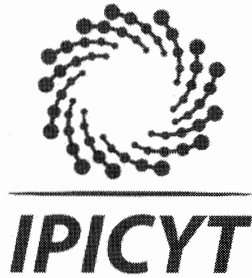
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Samuel Lara González

San Luis Potosí, S.L.P., Julio del 2017



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Caracterización bioquímica y estructural de un homólogo de XanA de *Aspergillus nidulans***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Fitzya Yasen Bocanegra Jiménez** y aprobada el **once de julio de dos mil diecisiete** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Samuel Lara González
Director de la tesis

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial

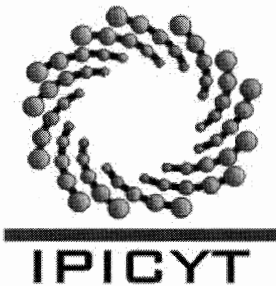
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Samuel Lara González

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 591422) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT CB-2011-01 No 168710 y por el proyecto CONACYT INFR-2013-01 No 204373



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 163 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de julio del año 2017, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|---|-------------------|---------------|
| Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro | Presidenta | IPICYT |
| Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont | Secretario | IPICYT |
| Dr. Samuel Lara González | Sinodal | IPICYT |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Fitzya Yasen Bocanegra Jiménez

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización bioquímica y estructural de un homólogo de XanA de Aspergillus nidulans

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Samuel Lara González

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 días del mes de julio de 2017.

Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

Al Dr. Samuel por la oportunidad y la confianza brindada para realizar mi tesis en su laboratorio, permitiéndome recurrir a su conocimiento científico cada vez que lo necesitaba. Gracias por su paciencia para guiarme en este proyecto.

A Livi, Esaú y Moni, los grandes amigos que hice a lo largo de esta travesía, que más que amigos se convirtieron en mi familia aquí en San Luis Potosí. Sin ustedes este trabajo hubiera sido mucho menos rico y entretenido. Gracias Livi por tu paciencia, motivación y excelente criterio, en este tiempo te has ganado mi total admiración y respeto. Gracias Esaú por tu sinceridad, por mostrarme la pasión por la ciencia y por ofrecerme tu amistad, ha sido un privilegio poder contar con tu guía y ayuda. Gracias Moni por ser una excelente amiga y hacer mucho más divertida esta etapa de mi vida, por impulsarme tanto profesional como personalmente, por tu generosidad y por estar presente en momentos difíciles.

A mis sinodales, por el interés que mostraron en mi trabajo, gracias por sus comentarios. A la Dra. Angélica y el Dr. Juan Carlos de quienes aprendí el amor por descubrir y explorar nuevos caminos. A las personas que en algún momento me brindaron su apoyo y simpatía, no podría nombrarlos a todos ya que sería muy extenso y podría cometer algún olvido injusto.

Gracias, con especial cariño, a los compañeros que he tenido a lo largo de esta etapa. A Clara, Claudia, Viri, Julián, Angélica, Karina, Ross con lo que he compartido pláticas entretenidas, momentos de diversión y risas casi interminables.

Y especialmente, con todo mi amor a los míos por estar incondicionalmente conmigo durante todos estos años y formar parte fundamental de la culminación de esta tesis. Gracias papas por todo el amor, comprensión, ánimo, y tolerancia que me han brindado. Gracias por enseñarme con el ejemplo, el significado de las palabras perseverancia, responsabilidad, trabajo arduo y amor incondicional. Gracias Liard por siempre estar a mi lado a pesar de nuestras diferencias, por impulsarme en cualquier situación siendo un pilar en momentos difíciles, por siempre creer en mí y mostrarme tu cariño sincero a pesar de la distancia. Gracias Jesusito por ser un constante recordatorio de la hermosura de la vida, siempre con tu buen humor y optimismo, te quiero corazón. Gracias abuela, por todo el tiempo que pasamos juntas, por tu amor y tus enseñanzas. Sabes que más que mi abuela fuiste como mi madre y espero tener alguna de las muchas cualidades que tú poseías, ¡siempre estarás en mi mente y en mi corazón!

Y a las personas que llegaron a ser sumamente importantes en mi vida, que dejaron una huella presente en mi corazón y que, por diversas situaciones ya no se encuentran presentes; gracias, porque algo de su esencia quedó grabada en mí y me ha impulsado en mi camino.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Al Dr. Samuel Lara González por la dirección y apoyo en este trabajo.

Al LANBAMA del IPICYT por el apoyo técnico y los servicios otorgados.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro y Dr.

Juan Francisco Jiménez Bremont, por las aportaciones en la tesis.

Contenido

| | |
|--|------|
| Constancia de aprobación de la tesis | ii |
| Créditos Institucionales | iii |
| Acta del examen | iv |
| Dedicatorias | v |
| Agradecimientos | vi |
| Lista de tablas | ix |
| Lista de Figuras | x |
| Anexos | xi |
| Resumen | xii |
| Abstract | xiii |
| | |
| RESUMEN | 02 |
| INTRODUCCIÓN | 03 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 07 |
| Selección de secuencias de genes homólogos a <i>xanA</i> de <i>A. nidulans</i> por medio de métodos bioinformáticos. | 07 |
| Clonación de los genes homólogos a XanA de <i>A. nidulans</i> . | 07 |
| Evaluación de la expresión y solubilidad de las proteínas. | 08 |
| Análisis por Western Blot | 08 |
| Ensayos de estabilidad térmica | 09 |
| Purificación optimizada | 09 |
| Ensayo preliminar de actividad enzimática | 11 |
| Cinética enzimática | 11 |
| Ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS) | 12 |
| Experimentos de cristalización | 12 |
| RESULTADOS | 13 |
| Selección de secuencias de genes homólogos a <i>xanA</i> de <i>A. nidulans</i> por medio de métodos bioinformáticos. | 13 |
| Clonación de los genes homólogos a XanA de <i>A. nidulans</i> . | 13 |
| Evaluación de la expresión y solubilidad de las proteínas. | 14 |
| Análisis por Western Blot | 14 |
| Ensayos de estabilidad térmica | 14 |
| Purificación optimizada | 15 |
| Ensayo preliminar de actividad enzimática | 16 |
| Cinética enzimática | 16 |
| Ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS) | 17 |
| Experimentos de cristalización | 17 |

| | |
|--------------------|----|
| DISCUSIÓN | 18 |
| CONCLUSIÓN | 30 |
| REFERENCIAS | 31 |
| ANEXOS | 54 |

Lista de tablas

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabla I. | Parámetros cinéticos de la proteína XanA de <i>A. nidulans</i> y XanA_oryzae (este trabajo). | 36 |
| Tabla II. | Características relevantes de las secuencias seleccionadas por métodos bioinformáticos con respecto a la secuencia de la proteína XanA de <i>A. nidulans</i> | 37 |
| Tabla III. | Evaluación de la expresión y solubilidad de las proteínas de <i>A. oryzae</i> , <i>E. lata</i> y <i>S. borealis</i> en diferentes cepas de <i>E. coli</i> | 38 |
| Tabla IV. | Diferentes condiciones evaluadas en el ensayo de estabilidad térmica | 40 |

Lista de Figuras

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1. | Construcciones obtenidas a partir de los genes homólogos de <i>xanA</i> de <i>A. nidulans</i> . | 42 |
| Figura 2. | Western blot de la purificación por IMAC de las tres proteínas y la eliminación de la etiqueta de histidinas de XanA_oryzae. | 43 |
| Figura 3. | Ensayo de estabilidad térmica de XanA_oryzae en las mejores condiciones identificadas por Thermofluor. | 45 |
| Figura 4. | Purificación optimizada de XanA_oryzae en tres pasos. | 46 |
| Figura 5. | Ensayo preliminar de xantina dioxigenasa. | 48 |
| Figura 6. | Cinética enzimática de XanA_oryzae. | 49 |
| Figura 7. | Experimentos de DLS con XanA_oryzae | 51 |
| Figura 8. | Condiciones sugestivas para la formación de cristales de XanA_oryzae | 53 |

Anexos

TABLAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabla S1. | Características de las construcciones que contienen el gen homólogo de <i>xanA</i> de <i>A. nidulans</i> | 55 |
|------------------|--|----|

FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura S1. | Mecanismo general de las hidroxilasas dependientes de Fe(II)/ α -cetoglutarato | 56 |
| Figura S2. | Purificación por exclusión molecular de XanA_oryzae en un amortiguador descrito en trabajos previos | 57 |
| Figura S3. | Mecanismo secuencial bi bi ordenado | 58 |
| Figura S4. | Cinética enzimática de XanA_oryzae en estado monomérico | 59 |

Resumen

Caracterización bioquímica y estructural de un homólogo de XanA de *Aspergillus nidulans*

La enzima XanA de *Aspergillus nidulans* de reciente descubrimiento, cataliza la conversión de xantina a ácido úrico como una ruta alternativa a la producción de ácido úrico en hongos. Es la primera enzima dependiente de α -cetoglutarato y Fe (II) que ha sido reportada que utiliza una purina libre como sustrato primario. Se considera exclusiva de hongos, hasta el momento ha sido poco estudiada y no se conoce su mecanismo de reacción ni estructura tridimensional. En el 2014, nuestro grupo de investigación, comenzó a trabajar con la enzima XanA de *A. nidulans*; sin embargo, no fue posible obtener un cristal de buena calidad que permitiera obtener un correcto patrón de difracción de rayos X. El objetivo central de este trabajo fue identificar y caracterizar una proteína homóloga a XanA de *A. nidulans* que presente características fisicoquímicas que le otorguen mayor probabilidad de éxito en el proceso de cristalización. Aquí mostramos tres secuencias homólogas a XanA de *A. nidulans* pertenecientes a los hongos *Sclerotinia borealis*, *Eutypa lata* y *Aspergillus oryzae*, las cuales nombramos como XanA_borealis, XanA_lata y XanA_oryzae, respectivamente. Estas secuencias se clonaron y expresaron como proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. En este proyecto se decidió caracterizar bioquímica y estructuralmente la proteína XanA_oryzae. Se optimizó su purificación en tres pasos y obtuvimos un rendimiento final de 4.12 mg de proteína /L de cultivo. Además se determinó la K_m de XanA_oryzae para α -cetoglutarato y xantina, y se propone que esta enzima presenta un “mecanismo secuencial bi bi ordenado”. También se realizaron varios ensayos de cristalización donde se obtuvo un posible cristal de XanA_oryzae en la condición que contiene 0.2 M acetato de zinc dihidratado, 0.1 M de cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5 y 18 % p/v de polietilenglicol 8,000, como agente precipitante.

Palabras clave: estructura-función proteína, cristalización, XanA, metabolismo de purinas.

Abstract

Biochemical and structural characterization of a XanA homologous protein from *Aspergillus nidulans*

The recently discovered XanA enzyme from *Aspergillus nidulans* catalyzes the conversion of xanthine to uric acid as an alternative route to the production of uric acid in fungi. It is the first α -ketoglutarate and Fe (II) -dependent enzyme that has been reported to utilize a free purine as the primary substrate. It is considered exclusive of fungi, up to now its reaction mechanism has been little studied and its three-dimensional structure is not known. In 2014 our research group began to work with the XanA enzyme of *A. nidulans*, however it was not possible to obtain a good quality crystal that would allow to obtain a correct X-ray diffraction pattern. The central aim of this work is to identify and to characterize an homologous to XanA of *A. nidulans* that presents physicochemical characteristics that give it greater probability of success in the process of crystallization. Here we report three sequences homologous to XanA of *A. nidulans* belonging to the organisms *Sclerotinia borealis*, *Eutypa lata* and *Aspergillus oryzae*; which we named as XanA_borealis, XanA_lata and XanA_oryzae respectively. These sequences were cloned and expressed as recombinant proteins in *Escherichia coli*. In this project it was decided to biochemically and structurally characterize the XanA_oryzae. Its purification was optimized in three steps, getting a final yield of 4.12 mg protein / L culture. In addition, the K_m of XanA_oryzae for α -ketoglutarate and xanthine was determined and it is proposed that this enzyme has a "bi bi sequential mechanism". Several crystallization tests were also carried out where a possible crystal of XanA_oryzae was observed in the condition containing 0.2M zinc acetate dihydrate, 0.1M sodium cacodylate trihydrate pH 6.5 and 18% w / v polyethylene glycol 8,000, as a precipitating agent.

Key words: structure-function protein, crystallization, XanA, purine metabolism.

Caracterización bioquímica y estructural de un homólogo de XanA de *Aspergillus nidulans*

Bocanegra-Jiménez F.Y.¹, Lara-González S^{1*}

¹ IPICYT, Laboratorio de Biología Estructural, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.

***Autor de correspondencia:** Samuel Lara-González,
Tel 01(444)834200 ext 6239
Correo electrónico: samuel.lara@ipicyt.edu.mx

Título corto: Caracterización de XanA_oryzae

Palabras clave: estructura-función proteína, cristalización, XanA, metabolismo de purinas.

RESUMEN

La enzima XanA de *Aspergillus nidulans* de reciente descubrimiento, cataliza la conversión de xantina a ácido úrico como una ruta alternativa a la producción de ácido úrico en hongos. Es la primera enzima dependiente de α -cetoglutarato y Fe (II) que ha sido reportada que utiliza una purina libre como sustrato primario. Se considera exclusiva de hongos, hasta el momento ha sido poco estudiada y no se conoce su mecanismo de reacción ni estructura tridimensional. En el 2014, nuestro grupo de investigación, comenzó a trabajar con la enzima XanA de *A. nidulans*; sin embargo, no fue posible obtener un cristal de buena calidad que permitiera obtener un correcto patrón de difracción de rayos X. El objetivo central de este trabajo fue identificar y caracterizar una proteína homóloga a XanA de *A. nidulans* que presente características fisicoquímicas que le otorguen mayor probabilidad de éxito en el proceso de cristalización. Aquí mostramos tres secuencias homólogas a XanA de *A. nidulans* pertenecientes a los hongos *Sclerotinia borealis*, *Eutypa lata* y *Aspergillus oryzae*, las cuales nombramos como XanA_borealis, XanA_lata y XanA_oryzae, respectivamente. Estas secuencias se clonaron y expresaron como proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. En este proyecto se decidió caracterizar bioquímica y estructuralmente la proteína XanA_oryzae. Se optimizó su purificación en tres pasos y obtuvimos un rendimiento final de 4.12 mg de proteína /L de cultivo. Además se determinó la K_m de XanA_oryzae para α -cetoglutarato y xantina, y se propone que esta enzima presenta un “mecanismo secuencial bi bi ordenado”. También se realizaron varios ensayos de cristalización donde se obtuvo un posible cristal de XanA_oryzae en la condición que contiene 0.2 M acetato de zinc dihidratado, 0.1 M de cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5 y 18 % p/v de polietilenglicol 8,000, como agente precipitante.

Palabras clave: estructura-función proteína, cristalización, XanA, metabolismo de purinas.

INTRODUCCIÓN

Aspergillus nidulans es un organismo capaz de crecer en un medio con xantina o hipoxantina como única fuente de nitrógeno. Esta característica está dada por la capacidad de *A. nidulans* de producir amonio a partir de ácido úrico por medio de una ruta convencional que incluye a las enzimas urato oxidasa, alantoinasa, alantoicasa, ureido-glicolasa y ureasa^{1,2,3,4}.

En *A. nidulans*, existen dos enzimas encargadas de la oxidación de la xantina a ácido úrico, la enzima xantina deshidrogenasa y la enzima xantina dioxigenasa dependiente de hierro y α -cetoglutarato o XanA^{3,5}. La enzima xantina deshidrogenasa se encuentra conservada en todos los organismos vivos, incluyendo archaeas, bacterias, hongos, plantas y metazoos⁶. Esta enzima es capaz de utilizar indistintamente hipoxantina o xantina como sustratos, generando como producto xantina o ácido úrico, respectivamente⁵. Este tipo de enzima cataliza la reacción en presencia de un aceptor de electrones; el cual habitualmente es NAD⁺^{5,7,8}, y es dependiente del cofactor molibdopterina o Moco^{5,7,9,10}. El cofactor Moco posee un átomo de azufre unido al molibdeno, el cual es indispensable para llevar a cabo su reacción y se sugiere que la inserción de este átomo se lleva a cabo por el producto del gen *hxB* en *A. nidulans*^{2,11,12}. A diferencia de la enzima xantina deshidrogenasa que puede utilizar dos sustratos para la generación de ácido úrico, la enzima XanA solo es capaz de utilizar xantina como sustrato y no se ve afectada en su actividad enzimática por la ausencia del cofactor molibdopterina ni del producto del gen *hxB*². Esta enzima no fue caracterizada hasta el año 2005, a pesar de que trabajos previos mostraban evidencia de una vía alternativa de degradación de la xantina^{5,7}.

El gen *xanA* que codifica para la proteína XanA de 370 aminoácidos, se encuentra en el cromosoma VIII de *A. nidulans*². Se identificó que XanA de *A. nidulans* pertenecía al grupo de las enzimas dioxigenasas dependientes de hierro y α -cetoglutarato; con un análisis bioinformático donde la única secuencia que presentó cierta similitud con la enzima XanA de *A. nidulans* fue la enzima TauD de *Escherichia coli*². TauD es una taurina dioxigenasa dependiente de hierro y α -cetoglutarato y posee un 18 % de identidad total y un 33% de identidad en las

regiones estructurales relevantes con la enzima XanA de *A. nidulans* ¹². Basado en esta semejanza, se identificaron dominios putativos de unión a Fe (II), conformado por la firma de HX (D/E) X₁₃₈₋₂₀₇ HX₁₀₋₁₃ R descrito en el subgrupo II de la superfamilia de las dioxigenasas ². Aunado al análisis bioinformático se comprobó experimentalmente que XanA de *A. nidulans* requería hierro y α -cetoglutarato para llevar a cabo su reacción ^{2,12,13}.

Una de las principales características de este tipo de enzimas es el uso de Fe (II) para activar el oxígeno molecular ¹³, utilizando un átomo de oxígeno molecular para oxidar un sustrato específico, mientras el segundo átomo oxida el cosustrato ². Se propone que en ausencia de los sustratos, una “tríada”; que habitualmente está formada por dos His y un Asp o Glu (His-X_n-Asp / Glu-X_n-His), se unen débilmente al hierro. Cuando el cosustrato se encuentra presente, el Fe (II) se coordina con el α -cetoglutarato en sus carboxilos C1 y C2 con el desplazamiento concomitante de dos moléculas de agua. La unión de α -cetoglutarato es estabilizada por la interacción de su carboxilato C5 con una arginina generalmente conservada.

La xantina no interactúa directamente con el hierro, pero provoca el desplazamiento de una molécula de agua lo cual genera un sitio libre para la unión de oxígeno molecular formando la especie Fe (III)-superoxo que genera la descarboxilación del α -cetoglutarato ¹³. La eliminación del CO₂ genera un intermediario altamente reactivo Fe (IV)=O², el cual es capaz de hidroxilar la xantina a ácido úrico con la reducción de Fe (II) liberando el succinato como producto de la descarboxilación del α -cetoglutarato ^{2,12,13} (Fig.S1).

Los residuos relevantes de la enzima XanA fueron identificados a través de mutación dirigida. Los residuos Lys122 y Arg352 participan en la estabilización de la unión al α -cetoglutarato; Glu137, Asp138, Cys357 y Asn358 juegan un papel fundamental en la unión a xantina y su catálisis; Gln356 se encuentra en el sitio activo y es capaz de formar un puente de hidrogeno con el grupo hidroxilo del carbono 6 y los residuos His149, Asp151 y His340 se cree participan en la unión a hierro por comparación de secuencias con otras enzimas ¹⁴.

Se ha reportado que la enzima XanA se localiza en el citoplasma y se ha detectado en los conidióforos de *A. nidulans*, solo presenta homólogos en los hongos y es

completamente inhibida por EDTA, Cu (II) y el Zn (II) ^{2,4,12}. XanA de *A. nidulans* es la primera enzima dependiente de hierro y α -cetoglutarato que utiliza una purina como sustrato primario ².

En el 2007, se purificó y caracterizó a la enzima XanA directamente del hongo *A. nidulans* y además mediante la expresión heteróloga del gen XanA en *E. coli*. Estas enzimas mostraron características diferenciales entre cada una de ellas. La primera diferencia fue el estado de agregación de cada una de las enzimas, al parecer los pesos estimados proporcionados por cromatografía de exclusión, sugerían que la enzima XanA de *A. nidulans* se encontraba en estado oligomérico (12 subunidades), mientras que la enzima obtenida a partir de *E. coli* se encontraba en estado monomérico ¹². La segunda diferencia fueron las modificaciones postraduccionales, la cuales variaban dependiendo del organismo de donde se aisló la enzima. Esta afirmación se basó en el hecho de que sólo las proteínas obtenidas de *A. nidulans* se encontraban glicosiladas (N-glicosilación y O- glicosilación) y ambas proteínas se encontraban fosforiladas, pero cada una con un patrón diferente ¹². También realizaron ensayos enzimáticos con la proteína XanA purificada tanto de *A. nidulans* como de *E. coli* y calcularon la K_m y k_{cat} de cada enzima para cada uno de los sustratos ¹² (Tabla I).

En nuestro grupo de trabajo en el 2014 se comenzó a trabajar con XanA de *A. nidulans* y se logró optimizar su purificación en dos pasos a partir de la expresión heteróloga de la proteína en *E. coli*. En ensayos cinéticos realizados con esta enzima se observó que la V_{max} de la reacción variaba con relación al orden de adición de los sustratos. Si la reacción se desencadenaba con α -cetoglutarato la V_{max} observada era de $0.6859 \pm 0.0361 \mu\text{moles min}^{-1}$. Por otro lado, si el factor desencadenante de la reacción era la enzima XanA, la V_{max} observada era de $0.2955 \pm 0.01579 \mu\text{moles min}^{-1}$, en cambio si el factor desencadenante de la reacción era la xantina, no se detectaba actividad enzimática alguna ¹⁵. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el 2005 donde se comprobó que la adición previa de α -cetoglutarato a la mezcla de reacción disminuye drásticamente la producción de ácido úrico ². Además de la optimización de la purificación de la proteína XanA de *A. nidulans* y los ensayos cinéticos, se realizaron ensayos de

cristalización para intentar dilucidar la estructura la enzima. Sin embargo, no fue posible la obtención de un cristal de buena calidad ¹⁵. Por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar homólogos de XanA de *A. nidulans* cristalizables, clonarlos en el vector pET28PPS, expresarlos en *E. coli* y seleccionar el homólogo con una mayor cantidad de proteína en la fracción soluble. Para posteriormente purificar el homólogo seleccionado, probar su estabilidad y caracterizarlo enzimáticamente. Además, utilizarlo en ensayos de cristalización para descifrar su estructura tridimensional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de secuencias de genes homólogos a *xanA* de *A. nidulans* por medio de métodos bioinformáticos.

Se realizó un Protein Blast en la base de datos de NCBI para identificar secuencias relacionadas a la proteína XanA de *A. nidulans*. Para filtrar el número de secuencias a analizar se utilizaron los siguientes criterios; se seleccionaron aquellas que estuvieran en el rango de tamaño deseado, que tuvieran conservados los aminoácidos relevantes implicados en la actividad de la enzima y que mostraran un porcentaje de similitud superior a 60% con la proteína XanA de *A. nidulans*. Las secuencias escogidas se sometieron a análisis en varios servidores para determinar la solubilidad; SPpred¹⁶ y PROSOII^{17,18}, y la propensión a cristalizar; XtalPred-RF^{19,20}, Crysalis^{21,22}, PDpredictor^{23,24}, CRYSTALP2^{25,26} y SECRET^{27,28}. Se eligieron las secuencias que poseían las mejores características según los servidores de XtalPred-RF, CRYSTALP2 y Crysalis II, y se sometieron a un análisis de estabilidad térmica por medio del servidor iRDP^{29,30}. Se seleccionaron 3 secuencias y los genes se optimizaron en el uso de codones para *E. coli* y se mandaron sintetizar a la empresa Integrated DNA Technologies (IDT).

Clonación de los genes homólogos a XanA de *A. nidulans*.

El vector de expresión que se utilizó para clonar los genes seleccionados fue un pET28 modificado (pET28PPS); donde el sitio de corte correspondiente a la trombina fue remplazado por el sitio de corte para la proteasa PreScission (PPS). Para clonar los genes sintéticos, se realizaron restricciones con 5 unidades de la enzima *NdeI* y *HindIII* (New England Biolabs), con 80 ng de los genes seleccionados y con 360 ng del vector pET28PPS por separado. Posteriormente se efectuaron reacciones de ligación con 10 unidades de la T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific) con cada uno de los genes y el vector en una relación molar de 3:1. Se transformaron células TOP10 con la ligación y las colonias positivas se seleccionaron por medio de PCR de colonia y ensayos de restricción enzimática.

Todas las construcciones se confirmaron por secuenciación con el método de dideoxinucleótidos marcados utilizando los oligonucleótidos externos T7.

Evaluación de la expresión y solubilidad de las proteínas

La expresión de cada una de las proteínas se evaluó en diferentes cepas de *E. coli*. Para ello se transformaron por choque térmico a las cepas de *E. coli*: BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3) Tf2 y BL21 (DE3) Arctic con cada uno de los plásmidos y se sembraron en agar suplementado con el antibiótico correspondiente. Una colonia de cada una de las transformantes se usó para crecer un cultivo de 5 mL de LB con el respectivo antibiótico durante toda la noche; 0.5 mL de este cultivo se destinó para inocular 10 mL de LB con el respectivo antibiótico; el cual se creció hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6. La expresión heteróloga se indujo con IPTG a una concentración final de 1mM y se evaluaron parámetros como temperatura y tiempo de incubación. Se tomó una muestra de 1mL antes y después de la inducción, estas muestras se sometieron a electroforesis SDS-PAGE.

Para evaluar la solubilidad, cada cultivo celular se resuspendió en un amortiguador 50 mM Tris pH.8.0, 300 mM NaCl y se lisó por sonicación. Cada muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos y se recuperó la fracción soluble de cada uno de los lisados celulares. Se tomó una muestra de 50 µL del lisado celular y la fracción soluble. La cantidad de proteína se estimó por el método de Bradford y las muestras se sometieron a electroforesis SDS-PAGE cargando la misma concentración de proteína en cada uno de los pozos. Las imágenes de los geles de poliacridamina se analizaron por densitometría con el programa ImageJ.

Análisis por Western Blot

Las muestras de interés se corrieron en un gel desnaturizante al 12%, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF en un sistema semi-seco a 15 volts durante 90 minutos (Thermo Fisher). La membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal 6x-His Epitope Tag de ratón (Thermo Fisher) a una dilución 1:3000. Posteriormente, la membrana fue lavada y se incubó con el anticuerpo secundario Anti IgG de ratón conjugado con la fosfatasa alcalina (abcam)

a una dilución 1:5000. Las bandas fueron visualizadas usando el kit Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate (Bio-Rad).

Ensayos de estabilidad térmica

Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron con la técnica “ensayo de desplazamiento térmico” (Thermal Shift Assay) también conocida como Thermofluor. El experimento se realizó en una placa de PCR de 96 pozos y se utilizó el equipo RT-PCR 7500 Fast (Applied Biosystems). En un volumen final de 40 μ L, la proteína, a una concentración final de 0.1 mg/mL se incubó en presencia de SYPRO ORANGE (Invitrogen) a una concentración final de 5X y con las condiciones a evaluar. El rango de temperatura que se evaluó fue de 25°C a 95°C y la fluorescencia emitida se capturó y graficó en Excel. Para obtener la T_m , los datos de la curva fueron ajustados a la ecuación de Boltzmann con el complemento Solver de Excel. El ensayo de Thermofluor se repitió, por triplicado con aquellas condiciones que mejoraban la estabilidad de la proteína.

Purificación optimizada

Cromatografía de afinidad a níquel con la columna de Agarosa Ni-NTA

Las células BL21 (DE3) Arctic se transformaron con el plásmido pET_ory (Tabla S1) y se inocularon en 500 mL de medio LB adicionado con kanamicina a una concentración final de 50 μ g/mL y gentamicina a una concentración final de 20 μ g/mL. La expresión de la proteína se indujo con IPTG a una concentración final de 1mM, durante 24 horas a 16°C. Al término de la inducción se recuperaron las células por medio de centrifugación a 6,000 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en 50 mL del amortiguador de lisis: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM β -mercaptoetanol, 1 M NaCl, 20 % Glicerol, 1 mM xantina, 40 μ M de FeSO₄, 10 mM de Imidazol y se lisaron por sonicación con 16 pulsos de 15 segundos a una amplitud de 50%, en hielo. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble, la cual se transfirió a una columna de 2 mL de agarosa Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada con amortiguador de lisis. El primer lavado consistió en 10CV de amortiguador de lisis y el segundo

lavado consistió en 7CV de amortiguador de lisis adicionado con 200 mM de Imidazol. Las fracciones se recolectaron y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE.

Corte de la etiqueta 6xHis con PreScission Protease (PPS)

La proteína recombinante, presente en las fracciones que eluyeron en el segundo lavado de la purificación por afinidad a níquel, se mezclaron e incubaron con 5 unidades/mL de la proteasa PPS a 4°C durante toda la noche para eliminar la etiqueta de histidinas. Se tomó muestra antes y después de la incubación con la proteasa y el corte fue evaluado por medio de SDS-PAGE.

Cromatografía de intercambio iónico con la columna HiTrap Q HP

La proteína sin etiqueta de histidinas se desaló por filtración en gel con una columna PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) para dejarla en el amortiguador 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM β -mercaptoetanol, 20 mM NaCl, 20 % Glicerol, 200 μ M xantina, 1 mM EDTA. La proteína desalada se filtró (0.22 μ m) e inyectó en una columna HiTrap Q HP (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada con el amortiguador que se utilizó para desalar a la proteína. Se utilizaron dos amortiguadores para la purificación por intercambio iónico; el amortiguador A que contenía 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM β -mercaptoetanol, 20 % Glicerol, 200 μ M xantina, 1 mM EDTA y el amortiguador B que contenía 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM β -mercaptoetanol, 20 % Glicerol, 200 μ M xantina, 1 mM EDTA y 1 M NaCl. Para la elución de las proteínas se utilizó un gradiente lineal de 2% a 50% de amortiguador B en 30CV con un flujo de inyección de 1 mL/min y un flujo de corrida de 2 mL/min. El volumen de las fracciones recolectadas fue de 3 mL las cuales se sometieron a electroforesis SDS-PAGE.

Cromatografía de exclusión molecular con la columna Superdex 75

Las fracciones donde eluyó la proteína recombinante en la purificación por intercambio iónico, se mezclaron y concentraron por microfiltración en un amicon Ultra-15 con membrana de retención de 10 kDa (Millipore). Posteriormente, la

proteína se filtró (0.22 μm) e inyectó en una columna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) equilibrada con el amortiguador 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM β -mercaptoetanol, 20 % Glicerol, 200 μM xantina y 300 mM NaCl. El volumen de la inyección fue de 500 μL , el flujo de corrida fue de 0.800 mL/min. Las proteínas fueron identificadas por absorbancia a 280 nm y se recolectaron en fracciones de 1 mL, las cuales se sometieron a electroforesis SDS-PAGE.

La columna Superdex 75 10/300 se calibró con las proteínas tiroglobulina (670 kDa), γ -globulina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) y Vitamina B12 (1.3 kDa). En cada uno de los pasos de purificación se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford para calcular el rendimiento en cada una de las etapas.

Ensayo preliminar de actividad enzimática

El ensayo de actividad enzimática se realizó en un volumen final de 1 mL en un amortiguador 50 mM de MOPS pH 7.4, 300 mM NaCl con concentraciones constantes de los sustratos y el cofactor: 40 μM FeSO_4 , 200 μM Xantina, 1 mM α -CG y 72 nM de la enzima (estado monomérico).

La reacción fue desencadenada con α -cetoglutarato y se evaluó la absorbancia a 268 nm (longitud máxima de absorbancia de xantina) y a 294 nm (longitud máxima de absorbancia del ácido úrico) a diferentes tiempos. Como blanco se utilizaron varias muestras que carecían ya sea de la enzima ó de alguno de los sustratos.

Cinética enzimática

Para realizar el ensayo de cinética enzimática se utilizó una microplaca de 96 pozos (Corning Costar) y el equipo Multiskan Go (Thermo Scientific).

Para determinar la K_m del sustrato α -cetoglutarato a 25 $^\circ\text{C}$, en un volumen final de 360 μL se utilizó el amortiguador 50 mM de MOPS pH 7.4, 300 mM NaCl con concentraciones constantes de FeSO_4 (40 μM), xantina (200 μM) y enzima (60 nM) variando las concentraciones de α -cetoglutarato de 5 a 1000 μM . Las reacciones fueron desencadenadas con el sustrato α -cetoglutarato, xantina y la enzima.

Para determinar la K_m del sustrato xantina a 25°C, en un volumen final de 360 μL se utilizó el amortiguador 50 mM de MOPS pH 7.4, 300 mM NaCl con concentraciones constantes de FeSO_4 (40 μM), α -cetoglutarato (1 mM) y enzima (60 nM) variando las concentraciones de xantina de 2.5 a 250 μM . Las reacciones fueron desencadenadas con el sustrato α -cetoglutarato. Para cada concentración se realizó un control sin enzima. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La producción de ácido úrico se midió por absorbancia a 294 nm ($\epsilon = 12,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se calculó la cantidad de micromoles de ácido úrico producidos por minuto por mg de enzima (U/mg).

Ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS)

Los ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS) se realizaron en el equipo Zetasizer APS (Malvern). En un volumen de reacción final de 50 μL , la proteína, a una concentración final de 1 mg/mL, fue incubada con concentraciones constantes de uno o varios de los sustratos en el amortiguador 50 mM de MOPS pH 7.4, 300 mM NaCl. Las concentraciones finales en el volumen de reacción eran FeSO_4 (40 μM), xantina (200 μM) y α -cetoglutarato (1 mM). El equipo fue programado para que realizara 15 lecturas por muestra durante 40 segundos a una temperatura de 25°C. Todas las condiciones se incubaron 5 minutos a 25°C antes de realizar la medición.

Experimentos de cristalización

Los ensayos de cristalización se realizaron mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada y se empleó el método de matriz esparcida. Se probó la matriz de condiciones de cristalización de Hampton Research (Kit Cristal Screen I y II) y la de MORPHEUS (MRC-LMB). Para cada condición se usaron 50 μL de precipitante y las gotas se colocaron en proporción 1:1, las cajas se sellaron y almacenaron a 14°C. Los experimentos de cristalización se monitorearon en el microscopio estereoscópico al momento de poner las gotas, a las 24 horas, a la primera, segunda, tercera y cuarta semana. Se realizaron diversos experimentos variando la concentración (8.5 mg/mL a 15 mg/mL) y la naturaleza de los amortiguadores donde se encontraba la proteína. En total se montaron 960 condiciones de cristalización.

RESULTADOS

Selección de secuencias de genes homólogos a *xanA* de *A. nidulans* por medio de métodos bioinformáticos.

En el ProteinBlast del NCBI, se identificaron 700 secuencias relacionadas a la proteína XanA de *A. nidulans*. Para reducir el número de secuencias a analizar se seleccionaron aquellas que estuvieran en el rango de tamaño deseado (300 secuencias), tuvieran conservados los aminoácidos relevantes implicados en la actividad de la enzima (156 secuencias) y que mostraran un porcentaje de similitud superior al 60% con la proteína XanA de *A. nidulans* (94 secuencias). Estas 94 secuencias se sometieron a análisis en servidores de predicción de cristalización, solubilidad y estabilidad térmica. Se escogieron 3 secuencias homólogas a XanA de *A. nidulans* que, de acuerdo con la predicción observada en los servidores, presentaban las mejores características en cuanto a solubilidad y propensión a cristalizar (Tabla II).

La secuencia homóloga encontrada en *Aspergillus oryzae* (XanA_oryzae, gi: 83766561) posee un 81% de identidad con la secuencia XanA de *A. nidulans* y de acuerdo al servidor Crysalis II se predice éxito en la cristalización.

En cambio la secuencia homóloga encontrada en *Eutypa lata* (XanA_lata, gi: 471571096) es una proteína más pequeña con un 70% de identidad con la secuencia XanA de *A. nidulans*, y de acuerdo a los servidores Crysalis II, CRYSTALP2 se predice éxito en la cristalización y en el servidor XtalPred-RF presenta un score de 3, en una escala de 1 al 5 donde 1 es el score más prometedor.

Por último la secuencia homóloga encontrada en *Sclerotinia borealis* (XanA_borealis, gi: 563298184) posee un 69% de identidad con la secuencia XanA de *A. nidulans* y conforme a los servidores Crysalis II, CRYSTALP2 se predice éxito en la cristalización.

Clonación de los genes homólogos a XanA de *A. nidulans*

Se obtuvieron las construcciones nombradas como pET-ory, pET-lata y pET-bor que contienen los genes de interés en el vector pET28PPS (Tabla S1), entre los sitios de corte *Hind*III y *Nde*I (Fig.1).

Evaluación de la expresión y solubilidad de las proteínas

La expresión y la solubilidad de cada una de las proteínas se evaluó en las cepas BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3) Tf2 y BL21 (DE3) Arctic de *E. coli*, a diferentes temperaturas y tiempos de inducción dependiendo de la cepa. Las muestras obtenidas de este experimento se sometieron a electroforesis SDS-PAGE al 12% y los geles se analizaron por densitometría.

Con base al análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida realizados en el programa ImageJ, se determinó que de las 4 cepas de *E. coli* que se utilizaron para expresar y evaluar la solubilidad de las tres proteínas, la que presentó un mejor rendimiento en la obtención de las proteínas recombinantes en la fracción soluble fue la cepa BL21 (DE3) Arctic (Tabla III).

Análisis por Western Blot

XanA_oryzae, XanA_lata y XanA_oryzae se purificaron hasta cromatografía de afinidad a níquel y eluyeron en un solo paso con 500 mM de Imidazol. Las fracciones que se obtuvieron en la elución con 500 mM de Imidazol de cada una de las purificaciones, se sometieron a un análisis por Western Blot (Fig. 2A, 2B).

El Western Blot nos muestra que se purificó a las proteínas correctas, ya que aparece una banda en el tamaño esperado (alrededor de 44 kDa), lo que indica que esas proteínas poseen la etiqueta de histidinas que es detectada por el anticuerpo primario monoclonal 6x-His Epitope Tag de ratón (carriles 4,7,10 de la Fig. 2B). Además, permitió comprobar que la etiqueta de histidinas (6x-His) se puede cortar al 100%, ya que en el carril donde XanA_oryzae fue incubada con la proteasa PPS no se detecta señal alguna (carril 13 de la Fig. 2A, 2B). Tomando en cuenta que, para realizar el Western Blot se cargó la misma cantidad de proteína en cada uno de los pozos, obtenemos como resultado adjunto que XanA_oryzae está presente en la fracción soluble en una mayor concentración.

Ensayos de estabilidad térmica

Con la finalidad de identificar aditivos que fueran capaces de mejorar la estabilidad térmica de XanA_oryzae, se realizó un tamizado de diversas condiciones entre las

que se encontraron diferentes pH, agentes reductores, sustratos y cofactores de la enzima, glicerol y concentraciones crecientes de sal.

Se identificaron los aditivos y las concentraciones de los mismos, que mejoraban la T_m (aumentaban) o permitían que la curva de desnaturalización se ajustara mejor a la ecuación de Boltzman. Las mejores condiciones en el tamizado fueron las siguientes: glicerol 20%, β -mercaptoetanol 15 mM, xantina 600 μ M, α -cetoglutarato 600 μ M, NaCl 1M y una combinación de xantina 400 μ M con α -cetoglutarato 400 μ M (Tabla IV). En los ensayos por triplicado se comprobó que el cambio sobre T_m de la proteína provocado por cada uno de los aditivos es reproducible. El NaCl 1M, α -cetoglutarato 600 μ M y el glicerol 20% incrementaron el T_m de la proteína en 4 °C, 5°C y 6°C respectivamente. Si bien, la xantina 600 μ M y la combinación de xantina 400 μ M con α -cetoglutarato 400 μ M no tuvieron un fuerte impacto en la T_m , si lo tuvieron en el incremento de la fluorescencia y forma de la curva, la cual se ajustó mejor a la ecuación de Boltzman (Fig. 3)

Purificación optimizada

Se optimizó la purificación de XanA_oryzae en tres pasos; purificación por cromatografía de afinidad a níquel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. En la purificación por afinidad a níquel XanA_oryzae eluyó a una concentración de Imidazol 200 mM (Fig. 4A). El amortiguador de lisis utilizado en esta etapa fue optimizado con base a los resultados de Thermofluor y el rendimiento de esta etapa de purificación fue de 43.4 mg de proteína/L de cultivo. La incubación de XanA_oryzae con la proteasa PPS permitió la eliminación completa de la etiqueta de histidinas de la proteína recombinante (Fig. 4B). En la purificación por intercambio iónico XanA_oryzae eluyó a una concentración entre 80 mM a 120 mM de NaCl (Fig. 4C, 4D). El rendimiento de esta etapa de purificación fue de 31.6 mg de proteína/L de cultivo. En la purificación por exclusión molecular XanA_oryzae eluyó en los mililitros del 11-13, que corresponde al monómero de la proteína (Fig. 4E, 4F). El amortiguador utilizado en esta etapa, el cual también fue optimizado con base a los resultados de Thermofluor permitió que la proteína permaneciera únicamente en estado

monomérico y que no formara agregados de alto peso molecular. El rendimiento de esta etapa de purificación fue de 4.12 mg de proteína/L de cultivo.

Ensayo preliminar de actividad enzimática

En el ensayo preliminar de actividad enzimática donde la reacción que fue desencadenada con α -cetoglutarato (1 mM), se observó un incremento en la absorbancia a 294 nm que corresponde a la formación del ácido úrico, con la concomitante disminución de absorbancia a 268 nm que corresponde a la depreciación de la xantina (Fig. 5). Los blancos que contenían FeSO_4 , α -cetoglutarato y/o XanA_oryzae no presentan absorbancia a 268 nm, al contrario de aquellos blancos que contenían xantina. Estos resultados comprueban que la proteína XanA_oryzae posee actividad de xantina dioxigenasa, como la descrita para XanA de *A. nidulans*.

Cinética enzimática

Una vez comprobada la actividad enzimática de XanA_oryzae en el ensayo preliminar, se decidió calcular los parámetros cinéticos a partir de un ensayo de cinética enzimática. Se calcularon la K_m y V_{max} para los dos sustratos de XanA_oryzae en equilibrio rápido. La K_m y V_{max} para la xantina, se determinó variando la concentración de xantina de 2.5 a 250 μM , manteniendo la concentración de α -cetoglutarato constante (1mM). La K_m para la xantina fue de $32.79 \pm 3.531 \mu\text{M}$ y el de la V_{max} es $1.405 \pm 0.04441 \mu\text{moles de ácido úrico min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Fig. 6B).

La K_m y V_{max} para el α -cetoglutarato, se determinó variando la concentración de α -cetoglutarato de 5 a 1000 μM , manteniendo la concentración de xantina constante (200 μM). Cuando la reacción es desencadenada con α -cetoglutarato la K_m para α -cetoglutarato es $130 \pm 11.73 \mu\text{M}$ y la V_{max} es $1.56 \pm 0.0488 \mu\text{moles de ácido úrico min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Cuando la reacción es desencadenada con xantina la K_m para α -cetoglutarato es $166.6 \pm 29.79 \mu\text{M}$ y la V_{max} es $1.019 \pm 0.06855 \mu\text{moles de ácido úrico min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Cuando la reacción es desencadenada con la enzima XanA_oryzae la K_m para α -cetoglutarato es $137.6 \pm 20.30 \mu\text{M}$ y el de la V_{max} es

0.2537 ± 0.0122 $\mu\text{moles de ácido úrico min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Fig. 6A). El valor de la V_{max} varía dependiendo del factor desencadenante de la reacción, y es mayor cuando éste es el α -cetoglutarato, seguido por xantina y la enzima.

Ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS)

Los experimentos de DLS a una concentración final de proteína de 1mg/mL muestran los siguientes datos. La enzima XanA_oryzae en el amortiguador sin sustratos presenta una masa de 41.2 ± 8.5 kDa monodispersa que es muy aproximada a la masa teórica del monómero que es de 41.76 kDa. De igual forma la enzima XanA_oryzae con α -cetoglutarato, xantina y FeSO_4 , y la enzima XanA_oryzae con α -cetoglutarato y xantina presentan una masa cercana a la teórica de 38.6 ± 12.9 kDa y 39.3 ± 6.4 kDa respectivamente, ambas muestras monodispersas. Ahora bien la enzima XanA_oryzae con xantina tiene una masa calculada de 65.7 ± 8.4 kDa monodispersa, que es un poco más grande que la masa teórica de la proteína (Fig. 7).

Experimentos de cristalización

Se han montado 960 pruebas de cristalización, en las cuales se han evaluado diferentes concentraciones de proteína con o sin la presencia de uno de los sustratos. En los ensayos a 9.2 mg/mL de XanA_oryzae en presencia de α -cetoglutarato (1 mM) y FeSO_4 (40 μM) se observa un 70% de condiciones con precipitado. Las condiciones más interesantes incluyen la condición 2 del Kit de Crystal Screen II (CS2-2); que contiene 0.5 M de cloruro de sodio, 0.01 M de cloruro de magnesio hexahidratado y 0.01 M de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, donde se observa separación de fases (Fig. 8A) y la condición 45 del Kit de Crystal Screen I (CS1-45); que contiene 0.2 M acetato de zinc dihidratado, 0.1 M de cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5 y 18 % p/v de polietilenglicol 8000, donde se observa un posible cristal (Fig. 8B).

DISCUSIÓN

Identificación de homólogos cristalizables de XanA de *A. nidulans*

Recientemente, se ha reportado que la enzima XanA de *A. nidulans* cataliza la conversión de xantina a ácido úrico como una ruta alternativa a la producción de ácido úrico en hongos^{2,14} y es la primera enzima dependiente de α -cetoglutarato y Fe (II) que ha sido reportada que utiliza una purina libre como sustrato primario¹². Se considera exclusiva de hongos y a pesar de ser muy interesante la enzima XanA de *A. nidulans* ha sido poco estudiada y no se conoce su mecanismo de reacción ni estructura tridimensional. Fue por ello que, tratando de dilucidar la estructura tridimensional, nuestro grupo de trabajo empezó a trabajar con XanA de *A. nidulans*, sin embargo no fue posible obtener un cristal de buena calidad que permitiera obtener un correcto patrón de difracción de rayos X¹⁵.

Justamente, una de las principales limitantes en la biología estructural de proteínas es la obtención de cristales de alta calidad para la determinación de la estructura^{20,24}. Es por ello que, la capacidad de predecir la posibilidad de cristalización a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína, puede ayudar a seleccionar homólogos de la proteína de interés que tienen más probabilidad de tener éxito en la cristalización²⁰. Con la finalidad de acelerar este proceso se han desarrollado varios enfoques computacionales que utilizan diversos algoritmos, los cuales son presentados al público en general en varios servidores como SECRET, CRYSTALP, OBScore, ParCrys, CRYSTALP2, MCSG-Z score, SCMCRYIS, SVMCRYIS, PPCPred, XtalPred-RF y CrysaliisII.

Realizamos una búsqueda de los rasgos de cada uno de los servidores, entre las que incluimos: el tipo de algoritmo usado, las características fisicoquímicas evaluadas y la base de datos utilizada para entrenar el algoritmo, consideramos, que los servidores XtalPred-RF, CRYSTALP2 y Crysaliis II podrían generar una predicción más acertada y precisa de las secuencias a evaluar. Para justificar esta decisión enseguida se detallan algunas de las características de estos tres servidores. XtalPred-RF utiliza un algoritmo de clasificación basado en el aprendizaje estadístico teórico llamado Random Forest, que toma en cuenta las

diferentes interacciones complejas multidimensionales entre diferentes variables. Las variables fisicoquímicas incluidas son: porcentaje de serina, longitud de secuencia, punto isoeléctrico, Gravy index, regiones desordenadas, entropía de superficie, hidrofobicidad, aspereza, índice de inestabilidad, composición de aminoácidos en la superficie y entropía de cadena lateral. El dataset que se utilizó para entrenar el algoritmo fue del tipo “under sampling” donde se redujeron los sets negativos de cristalización para balancear los datos de entrenamiento²⁰. CRYSTALP2 utiliza el método basado en la clasificación de Kernel que es un algoritmo de aprendizaje automático que se utiliza para el análisis de patrones. Las características bioquímicas y biofísicas que se incluyen en este análisis son: longitud de la proteína, masa molecular, punto isoeléctrico, contenido de aminoácidos aromáticos y azufrados, inserciones obtenidas a partir del alineamiento, estructura secundaria predicha, zonas desordenadas predichas, hélices transmembranales y péptido señal. Además, cabe mencionar que al parecer los resultados que arroja CRYSTALP2 se complementan con lo obtenidos en XtalPred ²⁶. Por su parte Crysalis II utiliza un algoritmo conocido como SVR que es un algoritmo de aprendizaje automático que estima las relaciones entre las variables y las clasifica en diferentes categorías, eliminando las características irrelevantes con el método de mínima redundancia máxima relevancia, seguido de la selección de las características más relevantes. Además de algunas propiedades fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos, también toma en cuenta las características de los tripéptidos o dipéptidos que se forman en la secuencia tales como; área superficial, orientación de cadenas, carga, donadores de puentes de hidrogeno, hidrofobicidad o potencial de Vander Waals. Los datos que arroja el servidor es una predicción del éxito o fracaso en cada una de las etapas importantes para la obtención de la estructura tridimensional de la proteína, entre las que se encuentran; clonación de la secuencia, producción de biomasa, purificación, cristalización y determinación de la estructura ²².

Con base a esta información se decidió realizar una búsqueda de secuencias homólogas de XanA de *A. nidulans* en NCBI. Estas secuencias homólogas se analizaron para identificar aquellas que conservaran todos los aminoácidos

relevantes (o con un solo cambio en el aminoácido Asp138) para la actividad de la enzima y que presentaran una similitud en la secuencia mayor al 60% con de XanA de *A. nidulans*. Los aminoácidos relevantes en la enzima *A. nidulans* son Lys122 y Arg352 que participa en la unión al α -cetoglutarato; Glu137, Asp138, Cys357 y Asn358 que participan en la unión a xantina y su catálisis, Gln356 que se encuentra en el sitio activo y Asp151, His149, y His340 que están implicados en la unión a hierro¹⁴. Sin embargo, el análisis de la secuencia de varios ortólogos de esta proteína indicó que el aminoácido **Asp138** presenta un papel menos relevante en la unión de xantina y enzimas dioxigenasas dependientes de Fe (II) y α -cetoglutarato que utilicen xantina como sustrato primario pueden presentar cambios en esta posición⁴. Las secuencias identificadas tomando en cuenta lo mencionado anteriormente se sometieron a análisis en varios servidores de propensión a cristalización. Los resultados que se tomaron en cuenta para seleccionar las secuencias con mayor propensión a cristalizar fueron precisamente los que arrojaron los servidores XtalPred-RF, CRYSTALP2 y Crysalis II. Las secuencias que se eligieron fueron la de los hongos *Eutypa lata*, *Sclerotinia borealis* y *Aspergillus oryzae* por presentar características de nuestro interés, pero cabe mencionar que ninguna de estas proteínas estaba caracterizada.

Identificación de la cepa de *E. coli* y de la proteína a utilizar en ensayos posteriores

Una vez que se obtuvieron las construcciones que contenían los genes de interés optimizados en el vector pET28PPS, se decidió probar cuál de las cepas de *E. coli* presentaban un mejor rendimiento en cuanto a expresión y obtención de la proteína de interés. Todas las cepas de *E. coli* (Tabla III) que se tienen en el laboratorio poseen el lisogen λ DE3 que codifica para la polimerasa T7 bajo el promotor lacUV5. Por ello, para inducir la expresión de las proteínas de interés en las cepas de *E. coli* transformadas con cada uno de los plásmidos, se usa IPTG; el cual se une al represor LacI y permite la transcripción de la polimerasa T7³¹.

En la cepa que se obtuvo un mejor rendimiento en la expresión y obtención de las proteínas fue la cepa BL21 (DE3) Arctic (Tabla III). La razón por la que se considera

se obtuvo una mayor cantidad de proteína en la fracción soluble es porque esta cepa contiene un plásmido que codifica para chaperonas Cpn10/Cpn60 de la bacteria psicrófila *Oleispira antartica*, lo cual permite crecer el cultivo a bajas temperaturas donde el metabolismo de *E. coli* es más lento y permite que las proteínas sean traducidas lentamente, aumentando la posibilidad de que sean plegadas correctamente por las chaperonas Cpn10/Cpn60, que son activas a bajas temperaturas. Se ha reportado que generalmente las proteínas plegadas correctamente permanecen en la fracción soluble evitando su acumulación en cuerpos de inclusión^{31,32}.

Una vez que se identificó la cepa a utilizar en nuestros posteriores experimentos, se dispuso analizar con cuál de las proteínas se obtenía un mejor rendimiento en cuanto a la cantidad de proteína de interés recuperada en la fracción soluble en la purificación por cromatografía de afinidad a níquel. Con la finalidad de comparar los rendimientos, las tres proteínas se purificaron en las mismas condiciones (Fig. 2A, 2B). El rendimiento de purificación por cromatografía de afinidad a níquel fue 3.36 mg de proteína/L cultivo para XanA_lata, 6.23 mg de proteína/L cultivo para XanA_borealis y 16.95 mg de proteína/L cultivo para XanA_oryzae. Con base a los resultados obtenidos se decidió trabajar con XanA_oryzae.

Ensayos de estabilidad térmica y purificación de XanA_oryzae

Una vez que se dispuso trabajar con XanA_oryzae, decidimos optimizar su purificación. Para lograrlo se realizó un “ensayo de desplazamiento térmico” o mejor conocido como Thermofluor para identificar aditivos que fueran capaces de mejorar la estabilidad térmica de XanA_oryzae. Esta técnica se basa en la interacción de un reactivo fluorescente extrínseco (en nuestro caso SYPRO orange) con las regiones hidrofóbicas de la proteína. SYPRO orange en solución acuosa se encuentra apagado pero cuando se intercala con las regiones hidrofóbicas generadas por un desplegamiento parcial o total de las proteínas, aumenta su fluorescencia. Por lo tanto, el desplegamiento de las proteínas causado por el aumento de temperatura puede ser monitoreado por el incremento de la fluorescencia. Esta técnica permite

entonces calcular la temperatura de desnaturalización en el punto medio de la transición térmica (T_m) de la proteína en diferentes condiciones ³³.

Los aditivos que mostraron un mayor efecto en la T_m fueron el NaCl 1M, α -cetoglutarato 600 μ M y el glicerol 20%. La fuerza iónica juega un papel fundamental en la estabilidad de varias proteínas, en el caso de XanA_oryzae el incremento de la T_m con altas concentraciones de cloruro de sodio, indica que la enzima XanA_oryzae requiere una alta fuerza iónica para mantenerse estable. También se ha reportado que la adición de cofactores, sustratos o ligandos estabilizan a la proteína en cuestión, lo cual se evidencia con el efecto del α -cetoglutarato sobre la estabilidad térmica de XanA_oryzae ^{34,35}. Además, los agentes aglutinantes son ampliamente utilizados para mantener las proteínas estables en una solución acuosa ³⁶, y uno de los más conocidos y utilizados es el glicerol. Se considera que el glicerol, al ser una molécula polar pequeña, se inserta en la primera capa de hidratación de las proteínas, lo cual genera estados más compactos de la misma. Además se ha propuesto que el glicerol es capaz de interactuar con los parches hidrofóbicos actuando como una interfase anfipática impidiendo así el desplegamiento de las proteínas y su agregación ^{33,36,37}, lo cual explicaría el aumento de 6°C de la T_m de XanA_oryzae en presencia de glicerol al 20%.

La xantina y la combinación de xantina con α -cetoglutarato no tuvieron un fuerte impacto en la T_m pero sí un incremento agudo de fluorescencia, lo que indica que existió un desplegamiento repentino de todas las proteínas en la muestra, que se genera cuando la proteína se encuentra en una sola conformación ³³. Para fines de cristalización el hecho de encontrar condiciones que permitan que la proteína se encuentre monodispersa es de especial interés, ya que se favorece las interacciones específicas entre macromoléculas, lo cual puede generar clusters ordenados que conlleve a la formación de un cristal ³⁸.

Algunos de los aditivos que mejoraron la estabilidad de XanA_oryzae se añadieron a los amortiguadores de lisis o elución. Las purificaciones realizadas con el amortiguador optimizado que contenía glicerol y xantina, permitieron eliminar completamente la etiqueta de histidina, presentaron un rendimiento superior y exhibieron mayor cantidad de fracción monomérica de la proteína XanA_oryzae

comparado con las purificaciones realizadas con amortiguadores no optimizados (Fig. S2, 4E, 4F), lo que corrobora los resultados obtenidos en el ensayo de desplazamiento térmico. En términos de rendimiento, la cantidad de proteína obtenida después de la purificación por cromatografía de exclusión molecular fue de 4.12 mg de proteína/L de cultivo con el amortiguador optimizado y de 2.58 mg de proteína/L de cultivo con el amortiguador no optimizado.

Identificación de actividad de xantina dioxigenasa para XanA_oryzae

Como se había mencionado anteriormente ninguna de las tres proteínas había sido caracterizada, así que antes de realizar más avances con XanA_oryzae se decidió realizar un ensayo preliminar de actividad enzimática que permitiera identificar si esta proteína catalizaba la misma reacción que la previamente reportada para XanA de *A. nidulans*. Para este ensayo, se utilizó el amortiguador MOPS 50mM pH 7.4 y concentraciones constantes de xantina, α -cetoglutarato y FeSO₄, condiciones previamente reportadas para la enzima XanA de *A. nidulans*^{12,14,15}. En este experimento se observó un aumento de absorbancia a 294 nm con la concomitante reducción de absorbancia a 268 nm (Fig. 5). Como la longitud de mayor absorbancia del ácido úrico es a 294 nm y la longitud de mayor absorbancia de la xantina es a 268 nm^{2,12,15} podemos entender que estos resultados indican la producción de ácido úrico a partir de la utilización de xantina, lo que comprueba que XanA_oryzae posee actividad de xantina dioxigenasa.

Caracterización enzimática de XanA_oryzae

Una vez que se comprobó en el ensayo preliminar que XanA_oryzae cataliza la producción de ácido úrico a partir de xantina y α -cetoglutarato, se decidió calcular los parámetros cinéticos de esta enzima. Los ensayos de cinética enzimática se realizaron en el amortiguador MOPS 50 mM pH 7.4 antes descrito, pero adicionado 300 mM de NaCl. La razón por la que añadió sal al amortiguador fue, para mantener la proteína estable en solución, dados los resultados de Thermofluor que mostraron una alta dependencia de la estabilidad de XanA_oryzae con el aumento de la fuerza iónica (Fig. 3).

La cinética enzimática donde se variaron las concentraciones de α -cetoglutarato mostró que el orden de adición de los reactivos afecta claramente la actividad de la enzima (Fig. 6A). Con base a los resultados obtenidos de esta cinética; donde la máxima actividad enzimática se obtiene cuando la reacción es desencadenada con α -cetoglutarato, podemos intuir que el orden de adición de reactivos para la enzima en XanA_oryzae es xantina y posteriormente α -cetoglutarato. Estas deducciones concuerdan con resultados obtenidos en la caracterización de la enzima XanA de *A. nidulans* donde comprobaron que la adición de α -cetoglutarato previo a la xantina disminuyen drásticamente ² o eliminan la actividad enzimática ¹⁵. Sin embargo, el posible orden de los reactivos en XanA_oryzae parece no coincidir con el orden de adición de reactivos reportado para las enzimas dependientes de Fe (II) no hemo ³⁹ y específicamente para TauD ⁴⁰. TauD es la proteína que se tomó como base en el 2005 para identificar posibles dominios del gen *xanA* de *A. nidulans* (33% de identidad en el sitio catalítico) y parece tener un mecanismo bi-bi ordenado en el que requiere la adición previa del α -cetoglutarato y la posterior adición del sustrato primario, en este caso taurina ⁴⁰ para llevar a cabo la reacción. Estas diferencias podrían deberse a que XanA_oryzae requiere una base purina como sustrato primario, elemento que no había sido reportado hasta el 2005 por lo que ninguna de las enzimas dependientes de Fe (II) no hemo hasta la fecha estudiadas presentan esta característica. Así que probablemente la afinidad por el sustrato primario; xantina en el caso XanA_oryzae, sea mayor que la afinidad por el α -cetoglutarato o que el mecanismo de acción sea diferente al de las enzimas hasta ahora caracterizadas.

Otros datos que soportan el orden de adición de los sustratos en XanA_oryzae antes mencionado, son los resultados obtenidos a partir del ensayo de dispersión dinámica de luz. La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) mide el movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas, la medición la realiza con la iluminación de las partículas con un láser y el análisis de las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada ⁴¹.

Con esta técnica se evaluaron los pesos moleculares de XanA_oryzae en diferentes condiciones. La proteína en presencia del amortiguador MOPS pH 7.4, NaCl 300

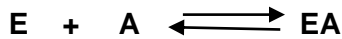
mM presenta un peso molecular de 41.2 ± 8.5 kDa (Fig. 7A), mientras que la proteína en presencia de xantina presenta un peso molecular de 65.7 ± 8.4 kDa (Fig. 7D). Y cuando la proteína se encuentra en presencia de xantina y α -cetoglutarato muestra un peso molecular de 39.3 ± 6.4 kDa (Fig. 7C).

Estos datos parecerían revelar que la adición del sustrato xantina causa que la proteína XanA_oryzae tome una conformación “más abierta”, lo cual se vería reflejado en el diámetro de su partícula, y por consiguiente en el cálculo de su masa molecular. Esta posible apertura podría facilitar el acceso del α -cetoglutarato, el cual al asociarse con XanA_oryzae y xantina parecería permitir que la enzima tomara una conformación más compacta para iniciar la reacción. Estos resultados complementan los datos observados en los ensayos de cinética enzimática y generan una explicación lógica de por qué la enzima XanA_oryzae requiere la adición de xantina de manera anticipada al α -cetoglutarato. Caso contrario a lo que sucede con la enzima TauD, donde conformación “cerrada” con la unión de la taurina al complejo TauD Fe(II) corroborada por rayos X impide el ingreso del α -cetoglutarato ⁴².

Para enzimas que requieren dos sustratos para llevar a cabo su reacción, la unión de estos sustratos puede ocurrir a través de dos mecanismos: secuencial o no secuencial. Si el sustrato forma un complejo enzima-sustrato antes de que la reacción se lleve a cabo y los productos sean liberados, se dice que la reacción es secuencial. Las reacciones secuenciales se subdividen en tres subgrupos: al azar, ordenadas o del tipo Theorell-Chance ⁴³. Con base a los resultados obtenidos y analizados previamente, se considera que el mecanismo por el que XanA_oryzae lleva a cabo su reacción es del tipo secuencial ordenado, más específicamente el “mecanismo secuencial bi bi ordenado” (Fig. S3), también propuesto para TauD de *E. coli* ⁴⁰ y comprobado para las enzimas como la glucosa-6-fosfatasa ⁴³, la succínico semialdehído deshidrogenasa de *Aspergillus niger* ⁴⁴ y la glucosa-1-fosfato timidiltransferasa de *E. coli* ⁴⁵ entre otras.

Con base al “mecanismo secuencial bi bi ordenado” donde; en nuestro caso A corresponde a xantina y B al α -cetoglutarato (Fig. S3), proponemos una posible explicación del por qué la V_{max} de la enzima XanA_oryzae varía de manera notable

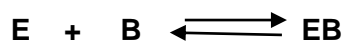
cuando la reacción es desencadenada con diferentes componentes. El valor superior de la V_{max} se obtuvo en la reacción que fue desencadenada con α -cetoglutarato y con una enzima incubada en presencia de concentraciones saturantes de xantina (A) de modo que:



al momento que se desencadena la reacción tenemos a toda la enzima formando el complejo EA por lo que al momento de adicionar el α -cetoglutarato (B):



se forma el complejo catalítico EAB y se observa la actividad máxima del sistema. Ahora bien cuando la reacción se desencadena con xantina, la V_{max} se vio disminuida a un nivel medio. Para la enzima TauD de *E. coli* se ha reportado que la unión de los sustratos es sinérgica ya que de K_d aparente para el α -cetoglutarato varía de 300 μ M en ausencia de taurina hasta 20 μ M en presencia de taurina ⁴⁰. Lo mismo puede estar pasando con la enzima XanA_oryzae, donde la K_d del α -cetoglutarato podría ser muy alta en ausencia de xantina y muy baja en presencia de la misma. En este caso, antes de desencadenar la reacción con xantina, la enzima se incubó con α -cetoglutarato. Si como se discutió previamente, la K_d de la enzima por el α -cetoglutarato es muy alta y la concentración de α -cetoglutarato usada no satura a la enzima libre (E), tenemos:



un equilibrio de este tipo con suficiente enzima libre (E), la cual es capaz de catalizar la reacción cuando añadimos xantina. Sin embargo, consideramos que la V_{max} se vio disminuida por la cantidad de complejo (EB) que estaba formado en el momento de desencadenar la reacción el cual no fue capaz de unirse a la xantina y llevar a cabo la reacción.

Por último la mayor disminución en la V_{max} se observó cuando la reacción fue desencadenada con la enzima. Esto podría deberse a múltiples factores que hayan podido influir de manera sinérgica para obtener el resultado de una V_{max} tan baja de

la enzima. En este caso el α -cetoglutarato, la xantina y el FeSO_4 se encontraban en la mezcla de reacción y la enzima fue añadida al final.

Como ya se discutió anteriormente una porción de la enzima pudo haber reaccionado con el α -cetoglutarato (B) presente en la muestra y formar el complejo EB, el cual no es capaz de unirse a la xantina. Ahora bien, si consideramos que todos los componentes para la reacción se encontraban en la mezcla, podemos especular que otra porción de la enzima formó un complejo EAB* demasiado rápido, lo cual impidió que la orientación de los sustratos fuera la requerida para llevar a cabo la reacción. La correcta orientación de los sustratos es de suma importancia⁴⁶, estudios previos han comprobado que la unión del sustrato primario en las enzimas dependientes de Fe (II) no hemo, inducen un rearrreglo en la orientación del carboxilato del R-ceto quelado (Costas et al., 2004) y que el O_2 debe encontrarse en una posición específica (comúnmente *cis*) hacia el carboxilato para que se lleve a cabo la reacción³⁹. Y por último otra porción de la enzima pudo formar un complejo EAB* que careciera de Fe (II) y que por lo tanto fuera inactivo. En este ensayo la enzima no fue incubada con FeSO_4 , a diferencia de los experimentos anteriores. Así que la concentración de Fe (II) presente en la mezcla pudo haber sido muy baja comparada con la constante de afinidad de XanA_oryzae por el FeSO_4 , generando que gran parte de la enzima no adquiriera Fe (II), el cual es fundamental para llevar a cabo la reacción.

Así que la combinación de uno o varios de estos sucesos, que en resumen se relacionan con la formación incorrecta o nula del complejo activo, pudieron haber generado que la actividad de la enzima se viera drásticamente disminuida. Un resultado que sustenta la deducción realizada en este trabajo, es la disminución de la formación del complejo activo en TauD de *E. coli* (TauD/Fe (II)/ α -cetoglutarato/taurina determinado por absorbancia a 520 nm) cuando se añaden simultáneamente todos los sustratos⁴⁰.

El otro parámetro cinético evaluado en estos experimentos fue la K_m tanto para el α -cetoglutarato como para la xantina. Los valores de las K_m para α -cetoglutarato determinadas en el amortiguador MOPS 50 mM pH 7.4, NaCl 300mM, son comparables aun cuando la reacción fue desencadenada de manera diferente. Las

K_m para α -cetoglutarato son $130 \pm 11.73 \mu\text{M}$, cuando la reacción es desencadenada con α -cetoglutarato, $166.6 \pm 29.79 \mu\text{M}$ cuando la reacción es desencadenada con xantina y $137.6 \pm 20.30 \mu\text{M}$ cuando la reacción es desencadenada con la enzima XanA *_oryzae* (Fig. 6A, Tabla I), se encuentran en un rango muy cercano. Sin embargo, la K_m para el α -cetoglutarato en el amortiguador MOPS 50 mM pH 7.4 sin sal, presenta un valor de $30.66 \pm 3.913 \mu\text{M}$ que es mucho más bajo que el anteriormente mencionado (Fig. S4, Tabla I). Este valor coincide con la K_m de la enzima XanA de *A. nidulans* para el α -cetoglutarato que es de $31.1 \pm 1.6 \mu\text{M}$ y fue determinado en el amortiguador MOPS 50 mM pH 7.4^{12,14}.

El valor de la K_m para xantina determinada en el amortiguador MOPS 50 mM pH 7.4, NaCl 300mM fue de $32.79 \pm 3.531 \mu\text{M}$ (Fig. 6B, Tabla I) que es muy cercano al valor reportado para la K_m de la enzima XanA de *A. nidulans* para la xantina que es de 45.2 ± 1.6 , el cual fue determinado en el amortiguador MOPS 50 mM pH 7.4^{12,14}. Estos resultados señalan que la K_m de α -cetoglutarato se ve fuertemente modificada por la fuerza iónica, mientras que la K_m de la xantina no cambia considerablemente en presencia una fuerza iónica mayor. Estos resultados coinciden con lo reportado en el 2007 para las K_m de la enzima XanA de *A. nidulans*¹².

A pesar de que las K_m coinciden con estudios anteriores, la V_{max} de XanA*_oryzae* observada en estos ensayos es muy pequeña comparada con la determinada para la enzima XanA de *A. nidulans*¹². Un ensayo posterior de cinética enzimática que realizamos tratando de optimizar las condiciones de reacción, reveló que la V_{max} de la enzima XanA*_oryzae* es mucho mayor que la reportada en los párrafos anteriores, alcanzando una V_{max} de 72.43 ± 5.378 (Fig. S4, Tabla I). Con estos resultados queda claro que es de vital importancia identificar las causas de la disminución de la actividad enzimática de la enzima XanA*_oryzae*, que consideramos está relacionada con el estado de oxidación del hierro y la concentración requerida del mismo. Para solucionar este problema, consideramos que sería una buena opción agregar ascorbato a la mezcla de reacción. Esta decisión se basa en el hecho de que se considera que el ascorbato revierte la inactivación enzimática del complejo enzima/Fe (III) que se genera cuando la

descarboxilación del α -cetoglutarato se desacopla de la oxidación del sustrato. Por lo tanto, se propone que el ascorbato actúa como reductor para devolver el centro metálico a su estado activo Fe (II) permitiendo tener la máxima actividad de las enzimas dependientes de Fe (II) y α -cetoglutarato ³⁹.

Un resultado sumamente interesante obtenido a partir del experimento de DLS es que, la proteína en presencia de xantina, FeSO₄ y α -cetoglutarato presenta un peso molecular de 38.6 ± 12.9 kDa (Fig. 7B), con lo que podemos suponer que el monómero de la proteína XanA_oryzae es el que lleva a cabo la reacción.

Ensayos de cristalización de XanA_oryzae

Por otro lado, en los ensayos de cristalización que se realizaron mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada, se han observado muchos precipitados, separación de fases y un posible cristal en la condición 45 del kit 1 de Crystal Screen (Hampton Research) que contiene 0.2 M acetato de zinc dihidratado, 0.1 M de cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5, 18 % m/v de polietilenglicol 8,000. Con la finalidad de encontrar la relación concentración de precipitante: concentración de proteína que favorezca que la proteína se encuentre en la zona lábil (sobresaturada) donde se lleva a cabo la nucleación, se ha considerado la posibilidad de realizar un experimento donde se varíen las concentraciones del precipitante de la condición CS1-45 y CS2-2.

CONCLUSIÓN

Se identificaron tres secuencias homólogas a XanA de *A. nidulans*, cuya predicción de propensión a cristalizar era mejor que la secuencia de XanA de *A. nidulans*. Se obtuvieron las construcciones pET-ory, pET- lata y pET-bor que contenían cada uno de los genes seleccionados en el vector pET28PPS. Además se optimizó la purificación por tres pasos para XanA_oryzae obteniendo un rendimiento 4.12 mg de proteína /L de cultivo. También se determinó la K_m de XanA_oryzae para el α -cetoglutarato y la xantina en un amortiguador que contenía NaCl, y con base a los resultados obtenidos se propone un “mecanismo secuencial bi bi ordenado” para XanA_oryzae, donde consideramos que la xantina debe incorporarse antes que el α -cetoglutarato. Así mismo, se realizaron pruebas de cristalización donde se observaron dos condiciones interesantes que muestran separación de fases y formación de un posible cristal de XanA_oryzae.

Como perspectivas de este trabajo queda optimizar las condiciones para realizar los ensayos de cinética enzimática, y repetir estos experimentos variando la concentración de uno de los sustratos, manteniendo el otro sustrato en diferentes concentraciones fijas, para poder identificar con mayor certeza el tipo de mecanismo que utiliza la enzima XanA_oryzae, graficando los datos en un diagrama de Lineweaver-Burk.

Además se pretende realizar varias mutaciones en la secuencia de XanA_oryzae, que permitirán el cambio de aminoácidos relevantes (D150A, H148A, K121A, N357A) en la unión de los sustratos, y utilizar estas variantes en ensayos cinéticos. Se espera que estas mutaciones afecten total o parcialmente la actividad enzimática de XanA, acorde a resultados obtenidos en estudios previos. Además de realizar más ensayos de cristalización con la enzima XanA_oryzae variando diferentes condiciones, entre los cuales se pretende el utilizar solo un sustrato, menor concentración de NaCl y disminuir la cantidad de glicerol. En caso de que no consigamos obtener un cristal con esta proteína, sería conveniente optimizar la purificación de las otras dos proteínas, caracterizarlas y utilizarlas en ensayos de cristalización.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca académica otorgada (No. de registro 591422) y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Al Dr. Samuel Lara González por la dirección y apoyo en este trabajo, a los miembros de mi comité tutorial, Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro y Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por las aportaciones en la tesis. Y a la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por su apoyo en este proyecto. Al proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT CB-2011-01 No 168710 y el proyecto CONACYT INFR-2013-01 No 204373.

REFERENCIAS

- [1] Scazzocchio, C., Darlington, A.J. (1968). The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys.* 166: 557–568.
- [2] Cultrone, A., Scazzocchio, C., Rochet, M., Montero-Morán, G., Drevet, C., Fernández Martín, R. (2005). Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Mol. Microbiol.* 57: 276–290.
- [3] Gournas, C., Oestreicher, N., Amillis, S., Diallinas, G., Scazzocchio, C. (2011). Completing the purine utilisation pathway of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 48: 840–848.
- [4] Galanopoulou Katerina, Scazzocchio Claudio, Galinoua Maria Eleftheria, Liub Weiwei, Borbolisa Fivos, Karachalioua Mayia, Oestreicherb Nathalie, Dimitris G. Hatzinikolaoua, Diallinasa George, Amillisa Sotiris. (2014). Purine utilization proteins in the Eurotiales: Cellular compartmentalization, phylogenetic conservation and divergence. *Fungal Genet Biol.* 69:96-108.

- [5] Scazzocchio Claudio, Sealy-lewis Heather M. (1978). A mutation in the xanthine dehydrogenase (purine hydroxylase I) of *Aspergillus nidulans* resulting in altered specificity. *Eur J Biochem.* 91(1):99-109.
- [6] Hille, R. (1996) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev* 96: 2757–2816.
- [7] Lewis, N.J., Hurt, P., Sealy-Lewis, H.M., Scazzocchio, C. (1978). The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. IV. A comparison between purine hydroxylase I and II. *Eur. J. Biochem.* 91: 311–316.
- [8] Mehra Raj K, Coughlan Michael P. (1989). Characterization of purine hydroxylase I from *Aspergillus nidulans*. [J Gen Microbiol.](#) 135(2):273-278.
- [9] Scazzocchio, C. (1973). The genetic control of molyboflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. Allopurinol resistant mutants constitutive for xanthine dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 36: 428–445.
- [10] Heck Immanuel S., Schrag Joseph D., Sloan Joan, Millar Lindsey J., Kanan Ghassan, Kinghorn James R., Unkles Shiela E. (2002). Mutational analysis of the gephyrin-related molybdenum cofactor biosynthetic gene *cnxE* from the lower eukaryote *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 161(2):623-632.
- [11] Amrani Laila, Cecchetto Gianna, Scazzocchio Claudio, Glatigny Annie. (1999). The *hxB* gene, necessary for the post-translational activation of purine hydroxylases in *Aspergillus nidulans*, is independently controlled by the purine utilization and the nicotinate utilization transcriptional activating systems. *Mol Microbiol.* 31(4):1065-1073.
- [12] Montero-Morán, G.M., Li, M., Rendón-Huerta, E., Jourdan, F., Lowe, D.J., Stumpff-Kane, A.W., Feig, M., Scazzocchio, C., Hausinger, R.P. (2007). Purification and characterization of the FeII- and alpha-ketoglutarate dependent xanthine hydroxylase from *Aspergillus nidulans*. *Biochemistry.* 46:5293–5304.
- [13] Simmons Jana M, Müller Tina A, Hausinger Robert P. (2008). FeII/ α -ketoglutarate hydroxylases involved in nucleobase, nucleoside, nucleotide, and chromatin metabolism. Published online 2008 Jun 27. Doi: 10.1039/b803512a

- [14] Li M., Müller T.A., Fraser B.A., Hausinger R.P. (2008). Characterization of active site variants of xanthine hydroxylase from *Aspergillus nidulans*. Arch Biochem Biophys. 470(1):44-53.
- [15] Segura-Covarrubias M.G., Lara-González S. (2015). Purificación, caracterización bioquímica y cristalización de la enzima XanA y dos variantes truncas en el extremo N-terminal. Tesis de maestría IPICYT.
- [16] [Servidor para predecir la solubilidad de una secuencia aminoacídica]. (Sin fecha). <http://crdd.osdd.net:8081/sppred/submit.jsp>
- [17] [Servidor para predecir la solubilidad de una secuencia aminoacídica]. (Sin fecha). <http://mips.helmholtz-muenchen.de/prosoll/prosoll.seam>
- [18] Smialowski P., Doose G., Torkler P., Kaufmann S., Frishman D. (2012). PROSO II-a new method for protein solubility prediction. FEBS J. 279(12):2192-2200. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08603.
- [19] [Servidor para predecir la propensión a cristalizar de una secuencia aminoacídica]. (2016) <http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>
- [20] Jahandideh,S., Jaroszewskia L.,Godzika,A,(2013). Improving the chances of succesful protein structure determination with random forest classifier. Biological Crystallography 70:627-635. doi: 10.1107/S1399004713032070
- [21] [Servidor para predecir la propensión a cristalizar de una secuencia aminoacídica]. (2016) <http://nmrcen.xmu.edu.cn/crysalis/>
- [22] Wang H., Feng L., Zhang Z., Webb G.I., Lin D., Song J. (2016). Crysalis: an integrated server for computational analysis and design of protein crystallization. Sci Rep. 6:21383. doi: 10.1038/srep21383
- [23] [Servidor para predecir la propensión a cristalizar de una secuencia aminoacídica]. (Sin fecha) <http://bioinformatics.anl.gov/cgi-bin/tools/pdpredictor/>
- [24] Babnigg G, Joachimiak A. (2010). Predicting protein crystallization propensity from protein sequence. J Struct Funct Genomics 11:71-80. doi: 10.1007/s10969-010-9080-0
- [25] [Servidor para predecir la propensión a cristalizar de una secuencia aminoacídica]. (2009). <http://biomine.cs.vcu.edu/servers/CRYSTALP2/>

- [26] Kurgan L., Razib AA., Aghakhani S., Dick S., Mizianty M., Jahandideh S. (2009). CRYSTALP2: sequence-based protein crystallization propensity prediction. *BMC Struct Biol* 9:50. doi: 10.1186/1472-6807-9-50.
- [27] [Servidor para predecir la propensión a cristalizar de una secuencia aminoacídica]. (2006). <http://mips.helmholtz-muenchen.de/secret/secret.seam>
- [28] Smialowski P., Schmidt T., Cox J., Kirschner A., Frishman D. (2006). Will my protein crystallize? A sequence-based predictor. *Proteins*. 62(2):343-355.
- [29] [Servidor para predecir la estabilidad térmica de una secuencia aminoacídica]. (2015). <http://irdp.ncl.res.in/>
- [30] Lee CW., Wang HJ., Hwang JK., Tseng CP. (2014). Protein thermal stability enhancement by designing salt bridges: a combined computational and experimental study. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0112751
- [31] ArcticExpress Competent Cells and ArcticExpress (DE3) Competent Cells Instruction Manual. Agilent Technologies, Inc. 2010.
- [32] Singh SM., Panda AK. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*. (4):303-310. DOI: 10.1263/jbb.99.303
- [33] Boivin S., Kozak S., Meijers R. (2013). Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expr Purif* 2:192-206. doi: 10.1016/j.pep.2013.08.002.
- [34] Vedadi M., Niesen FH., Allali-Hassani A., Fedorov OY., Finerty PJ Jr., Wasney GA., Yeung R., Arrowsmith C., Ball LJ., Berglund H., Hui R., Marsden BD., Nordlund P., Sundstrom M., Weigelt J., Edwards AM. (2006). Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. *Proc Natl Acad Sci* 103(43):15835-15840. doi: 10.1073/pnas.0605224103
- [35] Llamas-García M.L., Lara-González S. (2014). Expresión, purificación y caracterización de la enzima CGI58/ABHD5. Tesis de maestría IPICYT.
- [36] Vagenende V., Yap MG., Trout BL. (2009). Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*. 46:11084-11096. doi: 10.1021/bi900649t.

- [37] Eggers DK, Valentine JS. (2001). Crowding and hydration effects on protein conformation: a study with sol-gel encapsulated proteins. *J Mol Biol.* 4: 911-922. doi: 10.1006/jmbi.2001.5166
- [38] Mirjam Leunissen. (2001). "Principles of protein crystallization". An essay on several aspects of protein crystallization. Supervisor: Willem van Enckevort. Department of solid state chemistry.
- [39] Costas M., Mehn MP., Jensen MP., Que L Jr. (2004). Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates. *Chem Rev.* 2:939-986
- [40] Price John C., Barr Eric W., Hoffart Lee M., Krebs Carsten, Bollinger J. Martin. (2005). Kinetic Dissection of the Catalytic Mechanism of Taurine: α -Ketoglutarate Dioxygenase (TauD) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 44 (22): 8138–8147.
- [41] Zetasizer Nano Series User Manual. Malvern Instruments Ltd. England, 2004.
- [42] O'Brien, J. R., Schuller, D. J., Yang, V. S., Dillard, B. D., and Lanzilotta, W. N. (2003) Substrate-induced conformational changes in *Escherichia coli* taurine/R-ketoglutarate dioxygenase and insight into the oligomeric structure, *Biochemistry* 42: 5547-5554
- [43] Nuriye Nuray Ulusu. (2015). Evolution of Enzyme Kinetic Mechanisms. *J Mol Evol.*; 80(5-6): 251–257.
- [44] Kumar S., Kumar S., Punekar N.S. (2015). Characterization of succinic semialdehyde dehydrogenase from *Aspergillus niger*. *Indian J Exp Biol.* 53(2):67-74.
- [45] Zuccotti S., Zanardi D., Rosano C., Sturla L., Tonetti M., Bolognesi M. (2001). Kinetic and crystallographic analyses support a sequential-ordered bi bi catalytic mechanism for *Escherichia coli* glucose-1-phosphate thymidyltransferase. *J Mol Biol.* 2: 831–843.
- [46] Klinman Judith P., McCusker Kevin P. (2009). Modular behavior of tauD provides insight into the origin of specificity in α -ketoglutarate-dependent nonheme iron oxygenases. Published online 2009 Nov 5. Doi: 10.1073/pnas.0910660106

Tabla I. Parámetros cinéticos de la proteína XanA de *A. nidulans* y XanA_oryzae (este trabajo)

| Proteína | α -cetoglutarato | | | xantina | | |
|---|-------------------------|--|--------------------------------------|-------------------------|--|--------------------------------------|
| | K_m (μM) | V_{max} ($\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) | k_{cat} (s^{-1}) | K_m (μM) | V_{max} ($\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) | k_{cat} (s^{-1}) |
| XanA de <i>A. nidulans</i> ¹ | 31.1 \pm 1.6 | ---- | 66.5 | 45.2 \pm 1.6 | ---- | 71.4 |
| XanA de <i>A. nidulans</i> ² | 31 \pm 2 | ----- | 67 \pm 1 | 45 \pm 4 | ----- | 72 \pm 2 |
| XanA_oryzae ^a | 130.1 \pm 11.73 | 1.56 \pm 0.05 | 1.09 \pm 0.03 | 1.41 \pm 0.04 | | 0.98 \pm 0.03 |
| XanA_oryzae ^b | 166.6 \pm 29.79 | 1.02 \pm 0.07 | 0.71 \pm 0.05 | ----- | ----- | ----- |
| XanA_oryzae ^c | 137.6 \pm 20.30 | 0.25 \pm 0.01 | 0.18 \pm 0.01 | ----- | ----- | ----- |
| XanA_oryzae ^d | 30.66 \pm 3.91 | 4.28 \pm 0.12 | 2.97 \pm 0.08 | ----- | ----- | ----- |
| XanA_oryzae ^e | 194.7 \pm 30.70 | 72.43 \pm 5.38 | 50.41 \pm 3.74 | ----- | ----- | ----- |

¹ Parámetros cinéticos calculados en el amortiguador MOPS 50mM pH 7.4 en el año 2007 ¹². ² Parámetros cinéticos calculados en el amortiguador MOPS 50mM pH 7.4 en el año 2008 ¹⁴. ^a Determinado en el amortiguador MOPS 50mM pH 7.4, 300mM NaCl, la reacción se desencadenó con α -cetoglutarato. ^b Determinado en el mismo amortiguador de ^a, la reacción se desencadenó con xantina. ^c Determinado en el mismo amortiguador de ^a, la reacción se desencadenó con la enzima. ^d Determinado en el amortiguador MOPS 50mM pH 7.4, la reacción se desencadenó con α -cetoglutarato. ^e Determinado en el mismo amortiguador de ^a, la reacción se desencadenó con α -cetoglutarato y la enzima contenía xantina.

Tabla II. Características relevantes de las secuencias seleccionadas por métodos bioinformáticos con respecto a la secuencia de la proteína XanA de *A. nidulans*

| Características generales de la secuencia | | | BLAST | | | Análisis de propensión a cristalizar | | | |
|---|-------------|-----------------------------------|--|---------|-------|--------------------------------------|------------------|-------------|---------|
| | | | Comparada con XanA de <i>A. nidulans</i> | | | XtalPred-RF | CRYSTALP2 | Crysalis II | |
| Organismo | Aminoácidos | Aminoácidos relevantes | Query cover | E value | Ident | EP class | Clase | CF | CRYs |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | 370 | ----- | ----- | ----- | ----- | 4 | No cristalizable | Fracaso | Fracaso |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 369 | Cambia el D138 | 100% | 0 | 81% | 4 | No cristalizable | Éxito | Éxito |
| <i>Eutypa lata</i> | 349 | Todos los aminoácidos conservados | 89% | 0 | 70% | 3 | Cristalizable | Éxito | Éxito |
| <i>Sclerotinia borealis</i> | 375 | Todos los aminoácidos conservados | 98% | 0 | 69% | 4 | Cristalizable | Éxito | Éxito |

Principales características de las secuencias aminoacídicas homólogas a XanA de *A. nidulans* seleccionadas por sus características de propensión a cristalizar. Las secuencias seleccionadas presentaban una similitud superior a 60% con XanA de *A. nidulans*. El apartado de aminoácidos relevantes se refiere a la conservación de los aminoácidos implicados en la actividad enzimática en las diversas secuencias seleccionadas. **EP class (1-5)**: Clases de cristalización, donde 1 es la más prometedora y 5 la menos. **CF**: Propensión a cristalizar. **CRYs**: correcta difracción del cristal.

Tabla III. Evaluación de la expresión y solubilidad de las proteínas de *A. oryzae*, *E. lata* y *S. borealis* en diferentes cepas de *E. coli*

| Plásmido | Temperatura (°C) | Tiempo (h) | BL21 (DE3) Star | | BL21(DE3) pLysS* (Cam ^r) | | BL21 (DE3) Tf2** (Cam ^r) | | BL21(DE3) Arctic*** (Gen ^r) | |
|------------------------------|------------------|------------|-----------------|-------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------------------|-------------|---|-------------|
| | | | Expresión | Solubilidad | Expresión | Solubilidad | Expresión | Solubilidad | Expresión | Solubilidad |
| pET-ory (kan ^r) | 37 | 4 | Positivo | 3 | Positivo | 2 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | 28 | 12 | Positivo | 3 | Positivo | 2 | Positivo | 3 | ----- | ----- |
| | 18 | 16 | Positivo | 3 | Positivo | 2 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | 14 | 24 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | Positivo | 5 |
| pET-lata (kan ^r) | 37 | 4 | Positivo | 1 | Positivo | ND | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | 28 | 12 | Negativo | ND | Negativo | ND | Positivo | 1 | ----- | ----- |
| | 18 | 16 | Negativo | ND | Negativo | ND | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | 14 | 24 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | Positivo | 2 |
| pET-bor (kan ^r) | 37 | 4 | Positivo | 2 | Positivo | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | 28 | 12 | Positivo | 2 | Positivo | 1 | Positivo | 2 | ----- | ----- |
| | 18 | 16 | Positivo | 2 | Positivo | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | 14 | 24 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | Positivo | 3 |

Se realizaron ensayos de expresión y solubilidad de las tres proteínas seleccionadas a partir de métodos bioinformáticos en diversas cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos indicados. Cam^r: resistencia a cloranfenicol (34 µg/mL). Gen^r: resistencia a gentamicina (20 µg/mL). * BL21 (DE3) Star con el plásmido que codifica para una lisozima de la polimerasa T7, ** BL21 (DE3) Star con el plásmido que codifica para las chaperonas GroEL/GroES, *** BL21 (DE3) Star con el plásmido que codifica para las chaperonas Cpn10/Cpn60 de la bacteria psicrófila *Oleispira antartica*. **ND**: No determinada. **1-5**: Escala de cantidad de proteína en la fracción soluble, obtenida por medio de análisis densitométrico con el programa ImageJ, donde el valor de 1 se le asignó a la banda de la proteína de interés menos densa.

Tabla IV. Diferentes condiciones evaluadas en el ensayo de estabilidad térmica

| Condición | Compuesto | Concentración* | pH | Tm (°C) | | |
|---|-------------------|-----------------------------|-------------------|----------------|-----|-------|
| Proteína sin aditivo¹ | ----- | 0.1 mg/mL | 8.0 | 38.82 | | |
| pH¹ | MES | 50 mM | 5.5 | 34.10 | | |
| | MES | 50 mM | 6.0 | 37.09 | | |
| | MOPS | 50 mM | 6.5 | 39.27 | | |
| | MOPS | 50 mM | 7.0 | 39.54 | | |
| | HEPES | 50 mM | 7.5 | 39.67 | | |
| | Tris | 50 mM | 8.0 | 39.38 | | |
| | Tris | 50 mM | 8.5 | 40.61 | | |
| | Glicina | 50 mM | 9.0 | 31.01 | | |
| Estabilizador¹ | Glicerol | 5% | 8.0 | 39.99 | | |
| | | 10% | 8.0 | 41.75 | | |
| | | 15% | 8.0 | 42.65 | | |
| | | 20% | 8.0 | 43.25 | | |
| Ligando¹ | Xantina | 50 µM | 8.0 | 39.43 | | |
| | | 100 µM | 8.0 | 40.14 | | |
| | | 200 µM | 8.0 | 40.56 | | |
| | | 400 µM | 8.0 | 41.03 | | |
| | | 600 µM | 8.0 | 41.33 | | |
| | | 800 µM | 8.0 | 41.29 | | |
| | α-cetoglutarato | 50 µM | 8.0 | 40.02 | | |
| | | 100 µM | 8.0 | 40.37 | | |
| | | 200 µM | 8.0 | 40.49 | | |
| | | 400 µM | 8.0 | 41.03 | | |
| | | 600 µM | 8.0 | 41.33 | | |
| | | 800 µM | 8.0 | 41.28 | | |
| | | Cofactor¹ | FeSO ₄ | 10 µM | 8.0 | 38.01 |
| | | | | 20 µM | 8.0 | 38.57 |
| 30 µM | 8.0 | | | 38.98 | | |
| 40 µM | 8.0 | | | 38.12 | | |
| 50 µM | 8.0 | | | 38.32 | | |
| 60 µM | 8.0 | | | 37.93 | | |
| Detergente¹ | CHAPS | 1 mM | 8.0 | 39.18 | | |
| | | 1.5 mM | 8.0 | 39.67 | | |
| | | 2.0 mM | 8.0 | 39.80 | | |
| | | 2.5 mM | 8.0 | 39.11 | | |
| | | 3.0 mM | 8.0 | 38.95 | | |
| | | 3.3 mM | 8.0 | 37.62 | | |
| Agente reductor¹ | β-mercaptoentanol | 2 mM | 8.0 | 38.42 | | |
| | | 5 mM | 8.0 | 39.25 | | |
| | | 10 mM | 8.0 | 39.21 | | |

| | | | | |
|------------------------|------|--------|-----|-------|
| | | 15 mM | 8.0 | 38.19 |
| | | 20 mM | 8.0 | 39.58 |
| | | 3.3 mM | 8.0 | 39.55 |
| Sal¹ | NaCl | 100 mM | | 38.80 |
| | | 200 mM | 8.0 | 39.61 |
| | | 400 mM | 8.0 | 39.80 |
| | | 600 mM | 8.0 | 40.46 |
| | | 800 mM | 8.0 | 40.66 |
| | | 1 M | 8.0 | 42.38 |

XanA_oryzae se incubó en presencia del fluoróforo SYPRO orange (Invitrogen). Se evaluó un rango de temperatura de 25°C a 95°C y la fluorescencia emitida se capturó y graficó en Excel. Para obtener la Tm los datos de la curva se ajustaron a la ecuación de Boltzman. *Las concentraciones dadas son las concentraciones finales usadas durante el experimento. ¹ El experimento fue realizado con XanA_oryzae que conservaba la etiqueta de histidinas y se purificó en dos pasos, por cromatografía de afinidad a níquel y por cromatografía de exclusión molecular.

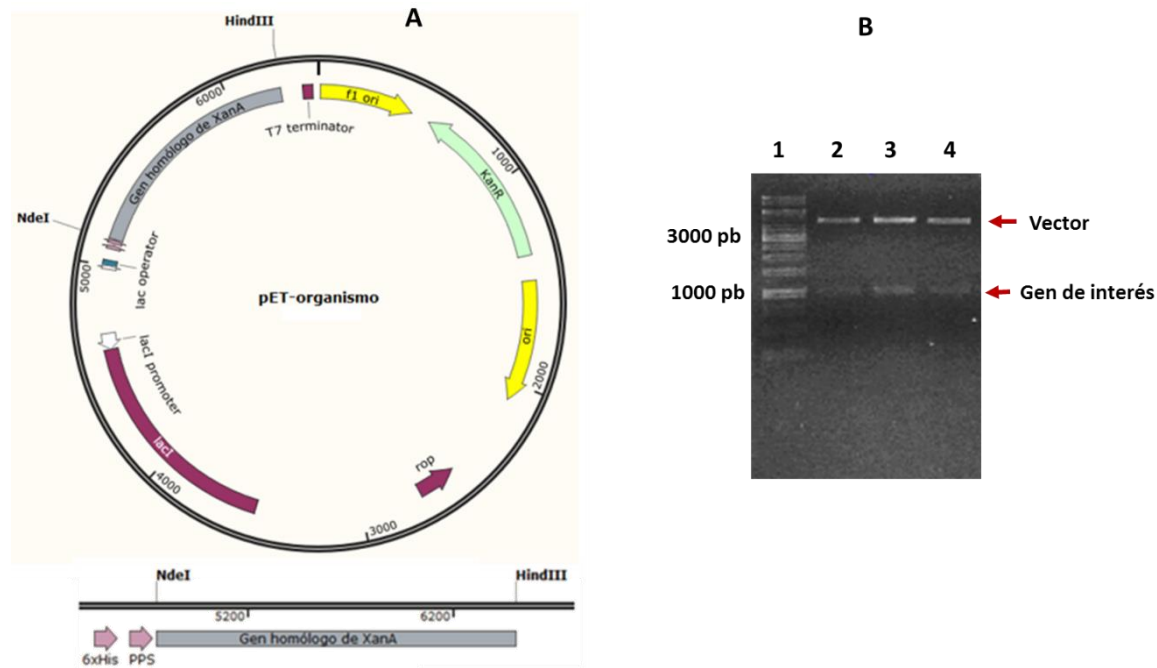


Figura 1. Construcciones obtenidas a partir de los genes homólogos de *xanA* de *A. nidulans*.

A) Esquema de las características generales de las construcciones obtenidas a partir de los genes homólogos de *xanA* de *A. nidulans*. Los genes se encuentran entre los sitios de corte *NdeI* y *HindIII* del vector pET28PPS y la etiqueta de histidinas se encuentra en el extremo amino terminal, seguido por un sitio de corte para la proteasa PPS. **B)** Electroforesis de las restricciones de las construcciones obtenidas con las enzimas *NdeI* y *HindIII*. **Carril 1.** Gene Ruler™ DNA Ladder. **Carril 2.** Restricción de la construcción pET-ory. **Carril 3.** Restricción de la construcción pET-bor. **Carril 4.** Restricción de la construcción pET-lata. Los tamaños de los genes para cada construcción se muestran en la Tabla S1.

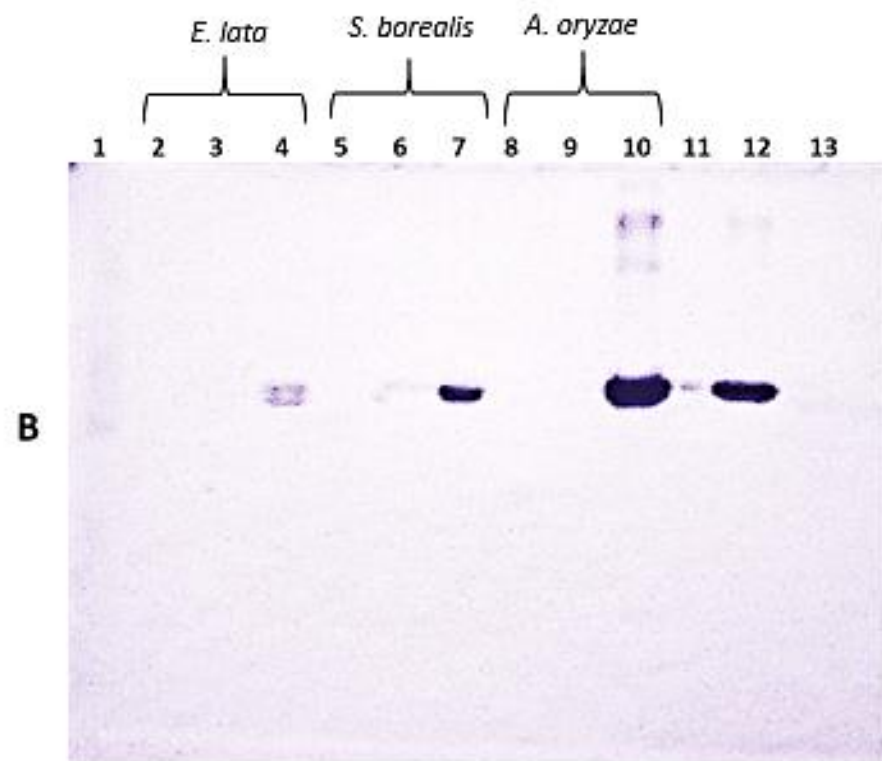
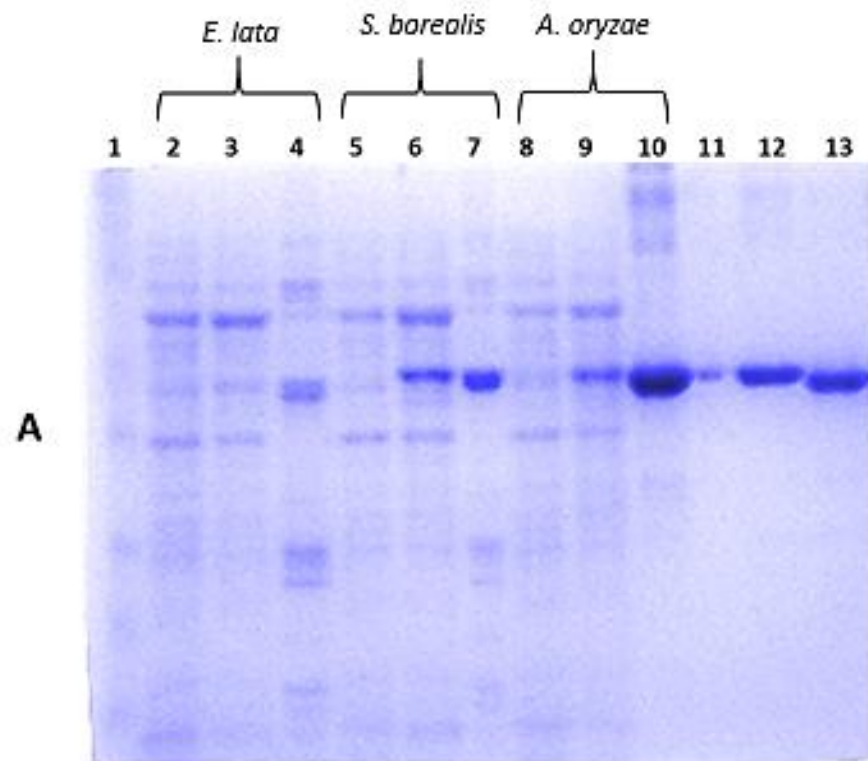


Figura 2. Western blot de la purificación por IMAC de las tres proteínas y la eliminación de la etiqueta de histidinas de XanA_oryzae.

A) Gel SDS-PAGE al 12% de poliacridamina teñido con Coomasie R-250. **B)** Membrana de PVDF revelada con el kit Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate (Bio-Rad). **Carril 1.** BenchMark Protein Ladder. **Carril 2.** Muestra antes de la inducción de XanA_lata. **Carril 3.** Muestra después de la inducción con IPTG de XanA_lata. **Carril 4.** Primera fracción del lavado con 500 mM de Imidazol de XanA_lata. **Carril 5.** Muestra antes de la inducción de XanA_borealis. **Carril 6.** Muestra después de la inducción con IPTG de XanA_borealis. **Carril 7.** Primera fracción del lavado con 500 mM de Imidazol de XanA_borealis. **Carril 8.** Muestra antes de la inducción de XanA_oryzae. **Carril 9.** Muestra después de la inducción con IPTG de XanA_oryzae. **Carril 10.** Primera fracción del lavado con 500 mM de Imidazol de XanA_oryzae. **Carril 11.** XanA_oryzae después de la purificación por afinidad a níquel. **Carril 12.** XanA_oryzae antes de la incubación con la proteasa PPS (con la etiqueta de histidinas). **Carril 13.** XanA_oryzae después de la incubación con la proteasa PPS (sin la etiqueta de histidinas). *Para realizar este experimento de Western Blot se utilizó el anticuerpo primario monoclonal 6x-His Epitope Tag de ratón y el anticuerpo secundario Anti IgG de ratón conjugado con la fosfatasa alcalina.

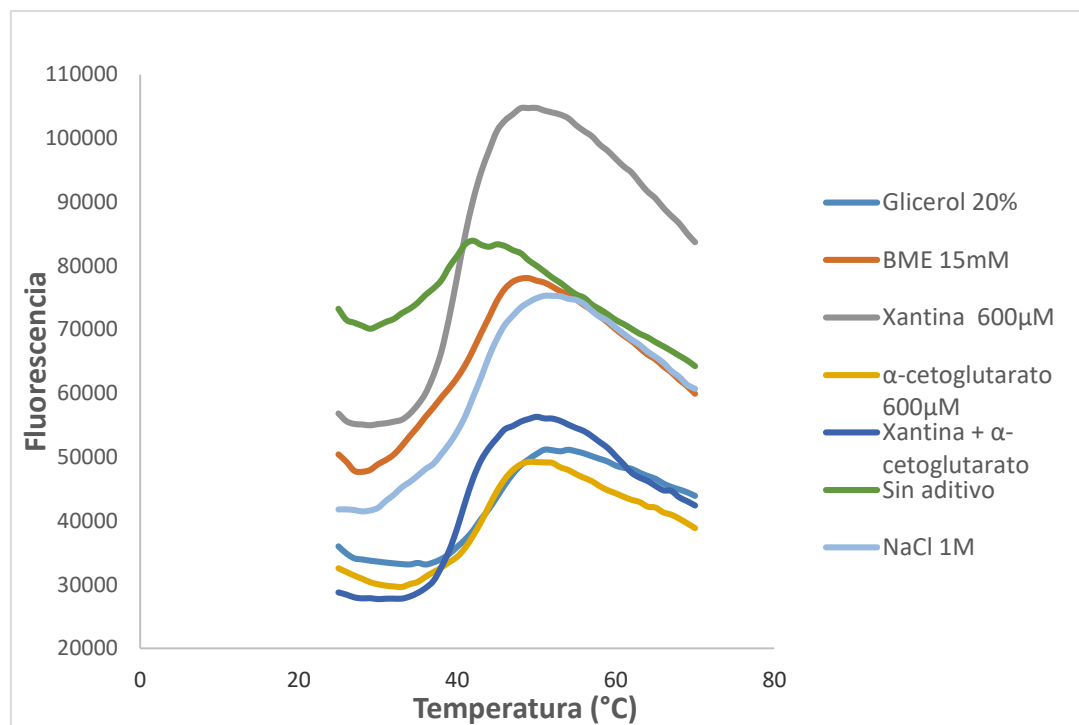


Figura 3. Ensayo de estabilidad térmica de XanA_oryzae en las mejores condiciones identificadas por Thermofluor.

Evaluación de la estabilidad térmica de XanA_oryzae. El eje de la ordenada corresponde a la fluorescencia y el eje de la abscisa a la temperatura en grados centígrados. La Tm de la proteína sin aditivo fue de 37.38 ± 0.58 , para el glicerol al 20% fue de 43.98 ± 0.08 , para el β -mercaptoetanol 15 mM fue de 39.79 ± 0.49 , para xantina 600 μ M fue de 39.74 ± 0.72 , para α -cetoglutarato 600 μ M fue de 42.44 ± 0.40 , para la combinación de xantina 400 μ M + α -cetoglutarato 400 μ M fue de 40.85 ± 0.18 y para el NaCl 1M fue de 41.50 ± 0.32 .

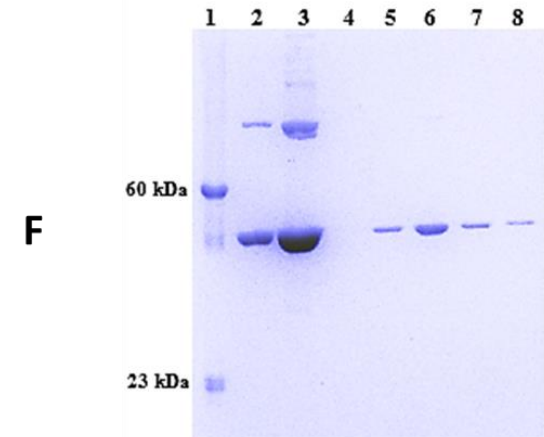
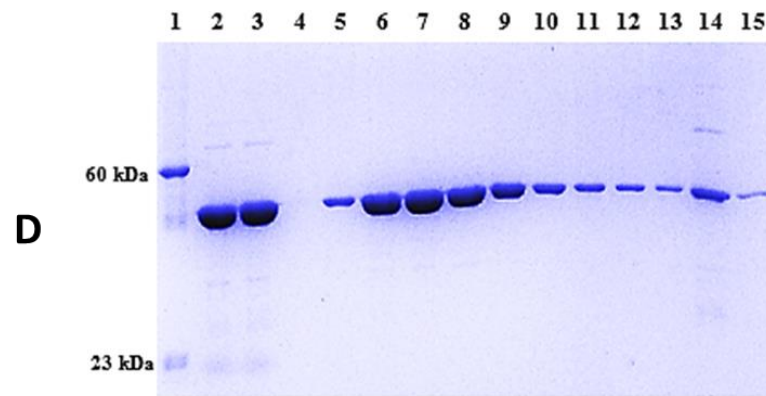
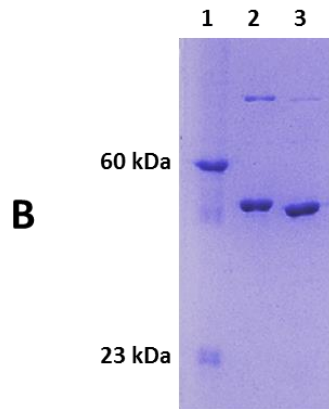
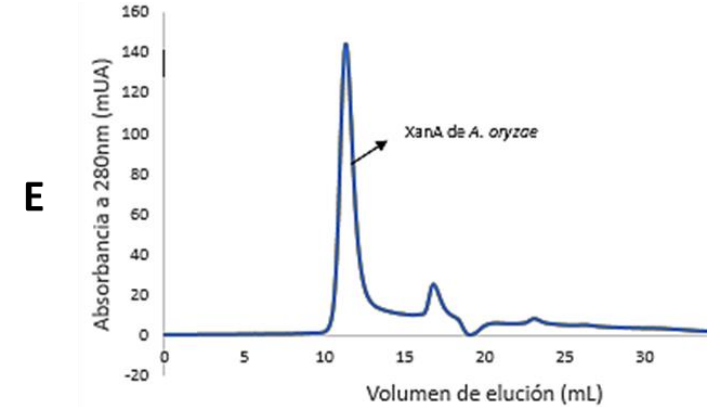
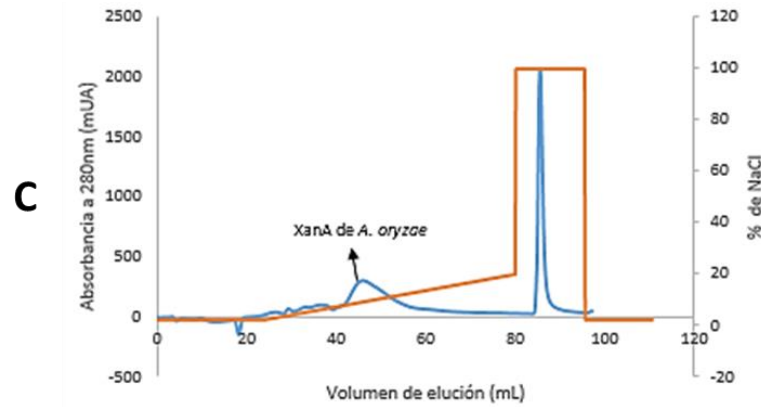
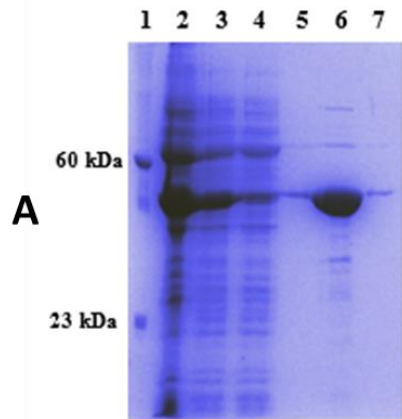
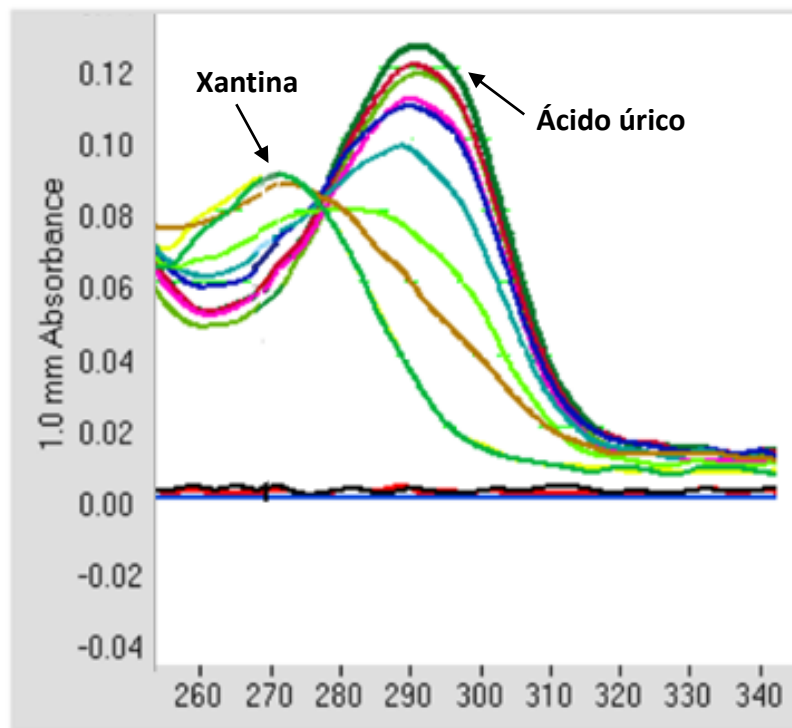


Figura 4. Purificación optimizada de XanA_oryzae en tres pasos.

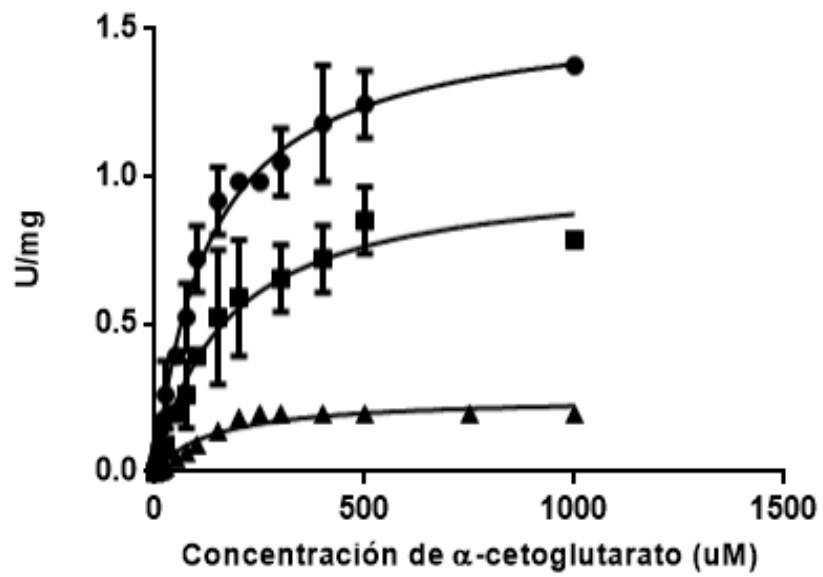
A) Purificación de XanA_oryzae por cromatografía de afinidad a níquel. Las proteínas se eluyeron en un solo paso con 200 mM de Imidazol y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE al 12%. **Carril 1.** Marcador*. **Carril 2.** Sonicado. **Carril 3.** Sobrenadante del sonicado. **Carril 4.** Frente del lavado. **Carril 5.** Elución de las proteínas con el amortiguador de lisis. **Carril 6,7.** Elución de las proteínas con 200mM de Imidazol. **B) Corte de la etiqueta 6xHis con PreScission Protease (PPS).** XanA_oryzae se incubó con 5 unidades/mL de la proteasa PPS a 4°C por 16 horas. **Carril 1.** Marcador*. **Carril 2.** XanA_oryzae antes de incubar con PPS. **Carril 3.** XanA_oryzae después de incubar con PPS. **C, D) Purificación de XanA_oryzae por cromatografía de intercambio iónico.** **C)** Cromatograma de XanA_oryzae purificada en una columna HiTrap Q HP (GE Healthcare Life Sciences) con un gradiente lineal de 2% - 50% de NaCl con 30 CV. El flujo de inyección y corrida fue de 1 y 2 mL /min respectivamente, y el volumen de inyección fue 14 mL. ** El pico ubicado en los mL 40-50 pertenece a XanA_oryzae. **D)** Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% de las proteínas purificadas por cromatografía de intercambio iónico. **Carril 1.** Marcador*. **Carril 2.** XanA_oryzae desalada. **Carril 3.** XanA_oryzae después de filtrar (0.22 µM). **Carril 4-11.** XanA_oryzae que eluyó en un rango de concentración NaCl de 80 mM a 120 mM. **Carril 12-15.** Proteínas que eluyeron en el lavado con 1M de NaCl. **E, F) Purificación XanA_oryzae por cromatografía de exclusión molecular.** **E)** Cromatograma de XanA_oryzae purificada en la columna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare). El volumen de las inyecciones fue de 500 µL, el flujo de corrida fue de 0.800 mL/min. **El pico ubicado en los mL 11-13 pertenece al monómero de XanA_oryzae. **F)** Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% de XanA_oryzae purificada por cromatografía de exclusión molecular. **Carril 1.** Marcador*. **Carril 2.** XanA_oryzae antes de concentrar. **Carril 3.** XanA_oryzae después de concentrar y filtrar. **Carril 4-8.** Monómero de XanA_oryzae purificada por cromatografía de exclusión molecular. *Contiene 0.5 ug de BSA (60 kDa) y 0.25 ug de PPS (23kDa). **Las ordenadas corresponden a la absorbancia en 280 nm, mientras que las abscisas corresponden al volumen de elución.



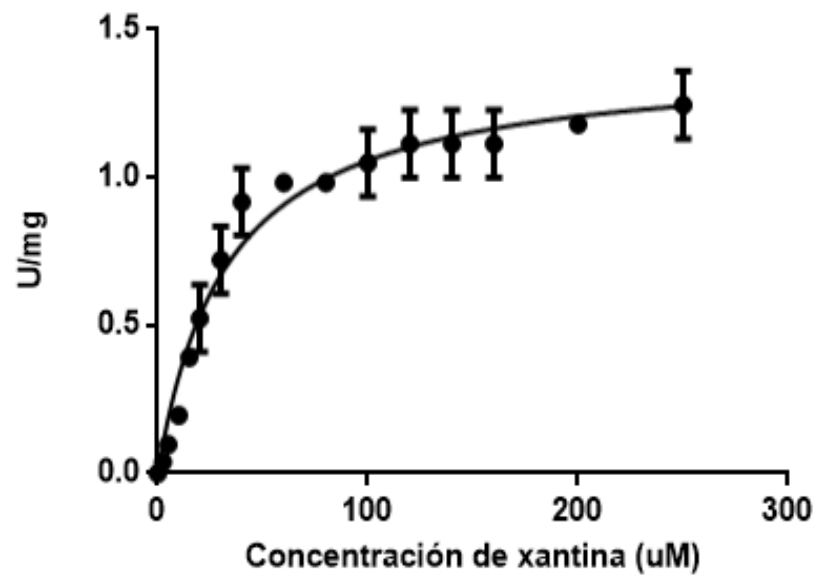
| Muestra (Buffer MOPS 50 mM pH 7.4) | Absorbancia | |
|---|-------------|--------|
| | 268 nm | 294 nm |
| FeSO ₄ | 0.002 | 0.001 |
| FeSO ₄ + enzima | 0.001 | 0.002 |
| FeSO ₄ + enzima + xantina | 0.088 | 0.028 |
| FeSO ₄ + xantina + α-cetoglutarato | 0.089 | 0.027 |
| Reacción al minuto 1 | 0.084 | 0.055 |
| Reacción al minuto 3 | 0.074 | 0.071 |
| Reacción al minuto 5 | 0.069 | 0.093 |
| Reacción al minuto 7 | 0.065 | 0.108 |
| Reacción al minuto 9 | 0.057 | 0.11 |
| Reacción al minuto 12 | 0.058 | 0.12 |
| Reacción al minuto 16 | 0.058 | 0.126 |
| Reacción al minuto 20 | 0.054 | 0.118 |

Figura 5. Ensayo preliminar de xantina dioxigenasa.

Para este ensayo se utilizaron concentraciones constantes de los sustratos y el cofactor: 40 μM FeSO₄, 200 μM xantina, 1 mM α -cetoglutarato, 72 nM de XanA_oryzae (estado monomérico) en amortiguador 50 mM MOPS pH 7.4, 300mM NaCl en un volumen final de 1 mL. Se evaluó la absorbancia a 268 nm y a 294 nm a diferentes tiempos. El eje de las abscisas corresponde a la longitud de onda y el eje de las ordenadas corresponde a la absorbancia.



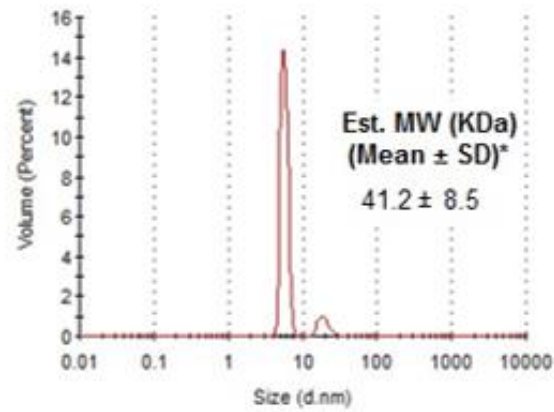
A



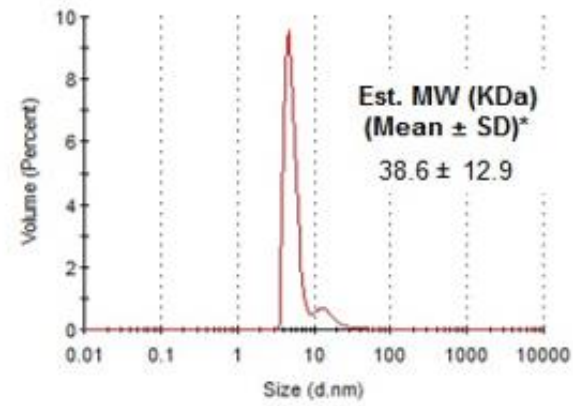
B

Figura 6. Cinética enzimática de XanA_oryzae.

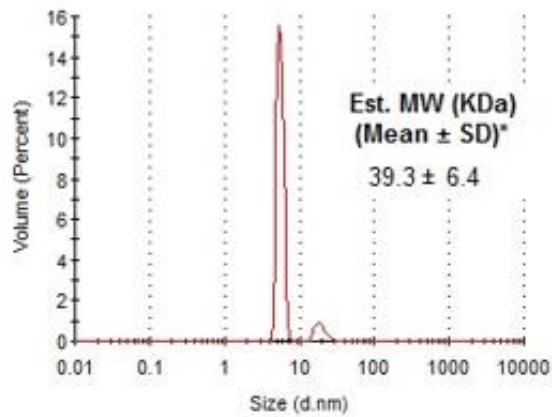
El eje de las abscisas representa la concentración del sustrato que se varió en cada una de las cinéticas y el eje de las ordenadas representa la actividad específica de la proteína XanA_oryzae (U/mg) la cual está definida como μ moles de producto por minuto por mg de proteína. **A)** Cinética enzimática para el sustrato α -cetoglutarato de XanA_oryzae que se realizaron a 25°C con concentraciones constantes de FeSO₄ (40 μ M), xantina (200 μ M) y la enzima XanA_oryzae (60 nM) variando las concentraciones de α -cetoglutarato de 5 a 1000 μ M. Las reacciones fueron desencadenadas con el sustrato α -cetoglutarato (●), xantina (■) y la enzima XanA_oryzae(★). **B)** Cinética enzimática para el sustrato xantina de XanA_oryzae que se realizaron a 25°C con concentraciones constantes de FeSO₄ (40 μ M), α -cetoglutarato (1 mM) y la enzima XanA_oryzae (60 nM) variando las concentraciones de xantina de 2.5 a 250 μ M. Las reacciones fueron desencadenadas con el sustrato α -cetoglutarato (●).



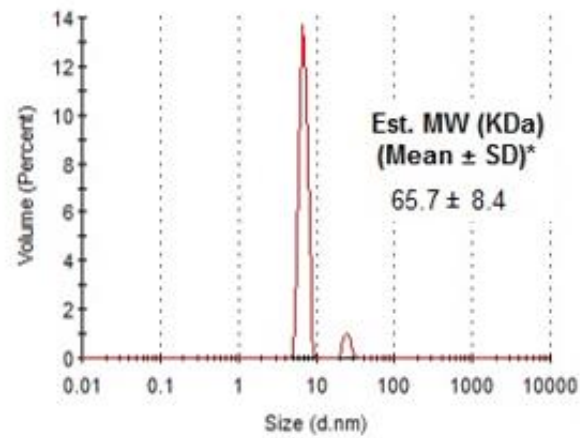
A



B



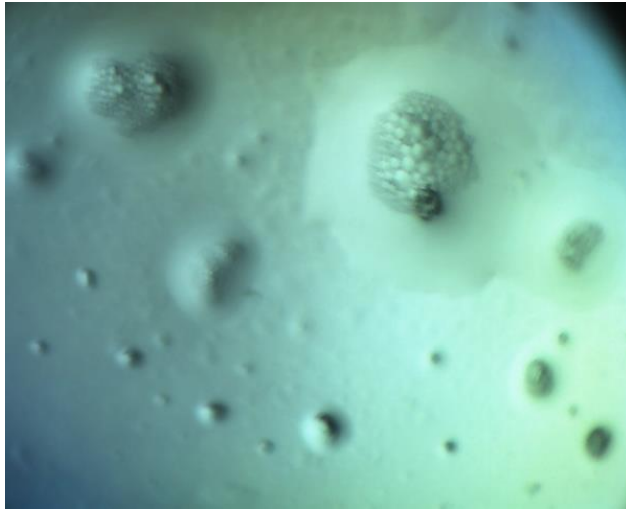
C



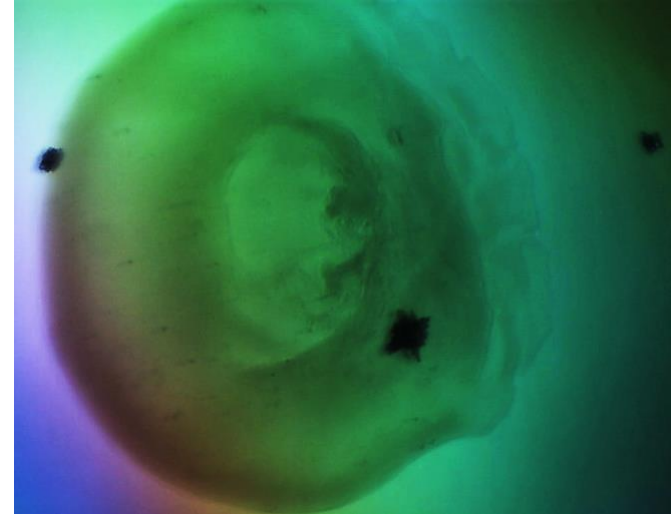
D

Figura 7. Experimentos de DLS con XanA_oryzae.

El ensayo se realizó con concentraciones constantes de FeSO_4 (40 μM), xantina (200 μM), α -cetoglutarato (1 mM) y enzima XanA_oryzae (1mg/mL). El eje de las abscisas representa el tamaño del diámetro de la partícula en nanómetros y el eje de las ordenadas representa el porcentaje de volumen de la partícula en la mezcla. A partir del tamaño de partícula se calcula el peso aproximado de la partícula (kDa). **A)** XanA_oryzae en el amortiguador con una masa aproximada de 41.2 ± 8.5 kDa. **B)** XanA_oryzae con α -cetoglutarato, xantina y FeSO_4 con una masa aproximada de 38.6 ± 12.9 kDa. **C)** XanA_oryzae con α -cetoglutarato y xantina con una masa aproximada de 39.3 ± 6.4 kDa. **D)** XanA_oryzae con xantina con una masa aproximada de 65.7 ± 8.4 kDa.



A



B

Fig. 8. Condiciones sugestivas para la formación de cristales de XanA_oryzae

A) Separación de fases obtenida a partir del experimento en gota sentada con una relación 1:1 de proteína: precipitante. La condición que se observa es la perteneciente a la segunda mezcla del kit de Crystal Screen II (CS2-2) que contiene 0.5 M de cloruro de sodio, 0.01 M de cloruro de magnesio hexahidratado y 0.01 M de bromuro de hexadeciltrimetilamonio. **B)** Posible cristal de XanA_oryzae obtenida a partir del experimento en gota sentada con una relación 1:1 de proteína: precipitante. La condición que se observa es la perteneciente a la mezcla 45 del kit de Crystal Screen I (CS1-45), que contiene 0.2 M acetato de zinc dihidratado, 0.1 M de cacodilato de sodio trihidratado pH 6.5 y 18 % m/v de polietilenglicol 8000. En el ensayo la proteína estaba en una concentración de 9.2 mg/mL en un amortiguador 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM β -mercaptoetanol, 1 M NaCl, 20 % Glicerol, 1 mM α -cetoglutarato y 40 μ M de FeSO₄.

ANEXOS

Caracterización bioquímica y estructural de un homólogo de *XanA* de *Aspergillus nidulans*

Bocanegra-Jiménez F.Y.¹, Lara-González S^{1*}

¹ IPICYT, Laboratorio de Biología Estructural, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.

***Autor de correspondencia:** Samuel Lara-González,
Tel 01(444)834200 ext 6239
Correo electrónico: samuel.lara@ipicyt.edu.mx

Tabla S1. Características de las construcciones que contienen el gen homólogo de *xanA* de *A. nidulans*.

Construcciones obtenidas a partir de los 3 genes homólogos a *xanA* de *A. nidulans* seleccionados y el vector pET28PPS. La estrategia utilizada para obtener las construcciones fue restricción con las enzimas *Hind*III y *Nde*I seguida de una ligación con el vector de clonación. ² cDNA optimizado manualmente utilizando tablas de codones de *E. coli*.

| Nombre de la construcción | Origen del gen | Tamaño del gen (pb) | Tamaño de la proteína (aa) | Resistencia | Descripción de secuencia según NCBI |
|---------------------------|---|---------------------|----------------------------|-------------|--|
| pET-ory ² | <i>Aspergillus oryzae</i> (gi:83766561) | 1107 | 369 | Kanamicina | Proteína no caracterizada |
| pET-lata ² | <i>Eutypa lata</i> (gi:471571096) | 1047 | 349 | Kanamicina | Xantina dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato putativa |
| pET-bor ² | <i>Sclerotinia borealis</i> (gi:563298184) | 1125 | 375 | Kanamicina | Dioxigenasa putativa |

Figura S1. Mecanismo general de las hidroxilasas dependientes de Fe(II)/ α -cetoglutarato.

Esquema que muestra el mecanismo catalítico propuesto para la enzima XanA_oryzae basado en el mecanismo general de las hidroxilasas dependientes de Fe(II)/ α -cetoglutarato ¹³.

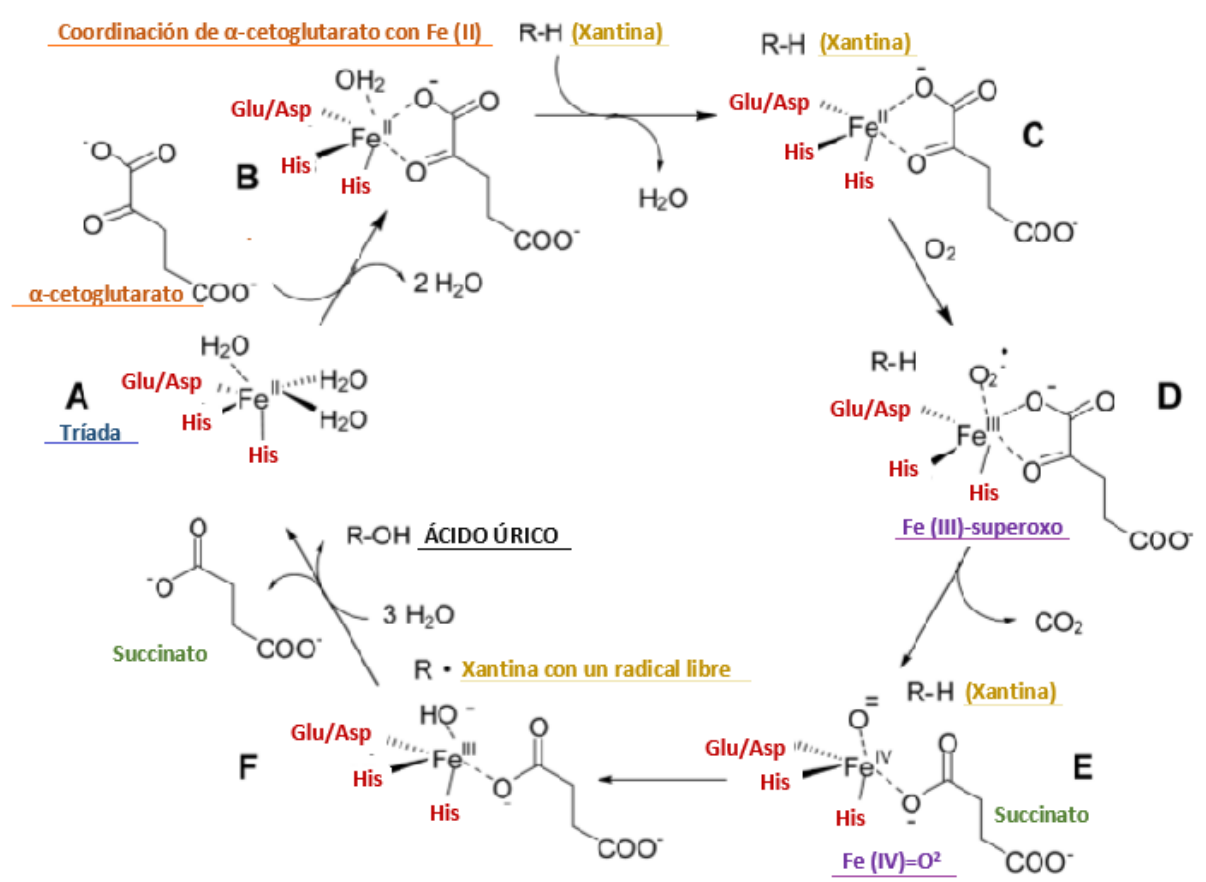
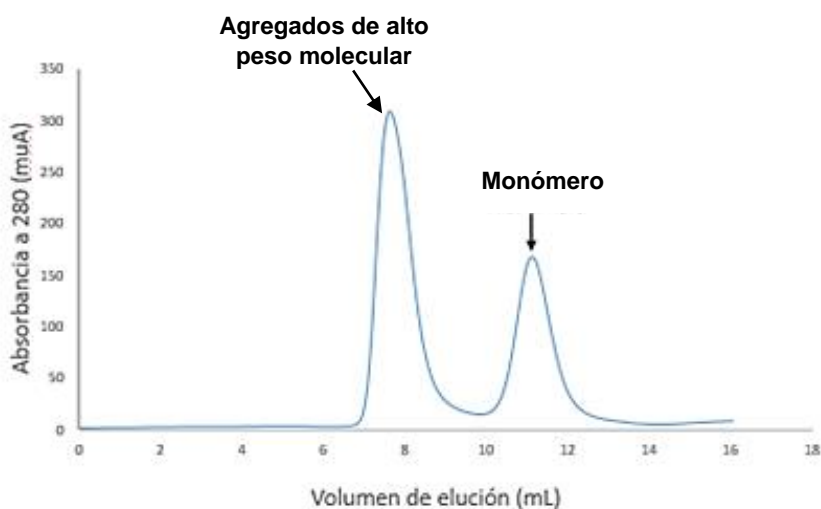


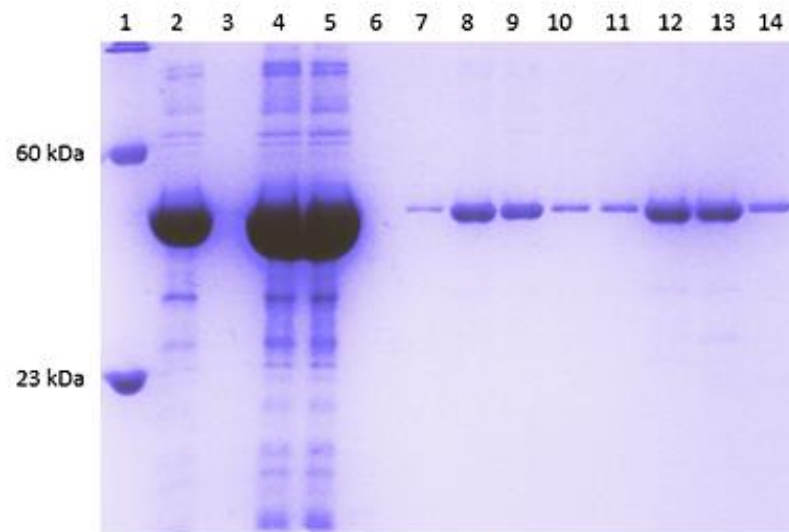
Figura S2. Purificación por exclusión molecular de XanA_oryzae con un amortiguador descrito en trabajos previos

A) Cromatograma de XanA_oryzae purificada por exclusión molecular en una columna Superdex 75 10/300. Las ordenadas corresponden a la absorbancia en 280 nm, mientras que las abscisas corresponden al volumen de elución. La corrida fue a un flujo 0.7 mL/min, el volumen de inyección fue 0.5 mL (3 inyecciones). El pico ubicado en los mL 10-14 pertenece al monómero de la proteína.

B) Gel SDS-PAGE al 12% de poliacridamina de la purificación por exclusión molecular de XanA_oryzae. **Carril 1.** Marcador de peso molecular; BSA 60 kDa, CAP 23 kDa. **Carril 2.** XanA_oryzae antes de concentrar. **Carril 3.** Frente de la concentración. **Carril 4.** XanA_oryzae después de concentrar. **Carril 5.** XanA_oryzae concentrada y filtrada. **Carril 6-10.** Fracciones que contenían agregados de alto peso molecular de la proteína XanA_oryzae. **Carril 11-14.** Fracciones que contenían la fracción monomérica de XanA_oryzae. El rendimiento de purificación fue de 2.58 mg/L de cultivo.



A



B

Figura S4. Cinética enzimática de XanA_oryzae en estado monomérico.

El eje de las abscisas representa la concentración del sustrato que se varió en cada una de las cinéticas y el eje de las ordenadas representa la actividad específica de la XanA_oryzae (U/mg). **A)** Cinética enzimática para el sustrato α -cetoglutarato de XanA_oryzae que se realizó con concentraciones constantes de FeSO_4 (40 μM), xantina (200 μM) y la enzima XanA_oryzae (60 nM) variando las concentraciones de α -cetoglutarato de 5 a 500 μM . Las reacciones fueron desencadenadas con el sustrato α -cetoglutarato. El parámetro de K_m para α -cetoglutarato es 30.66 ± 3.913 μM y el de la V_{max} es 4.273 ± 0.1178 $\mu\text{moles de ácido úrico min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (●). **B)** Cinética enzimática para el sustrato α -cetoglutarato de XanA_oryzae que se realizó con concentraciones constantes de FeSO_4 (40 μM), xantina (200 μM) y la enzima XanA_oryzae (60 nM) variando las concentraciones de α -cetoglutarato de 5 a 500 μM . Las reacciones fueron desencadenadas con el sustrato α -cetoglutarato. El parámetro de K_m para α -cetoglutarato es 194.7 ± 30.70 μM y el de la V_{max} es 72.43 ± 5.378 $\mu\text{moles de ácido úrico min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (●).

