



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Purificación, caracterización bioquímica y
cristalización de la enzima XanA y dos variantes
truncas en el extremo N-terminal.**

Tesis que presenta

Ma Guadalupe Segura Covarrubias

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., Febrero 2016.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Purificación, caracterización bioquímica y cristalización de la enzima XanA y dos variantes truncas en el extremo N-terminal”*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ma. Guadalupe Segura Covarrubias** y aprobada el **dos de febrero del dos mil dieciséis** 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. Gerardo Rafael Argüello Astorga
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 297721) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP- CONACyT No CB2011-168710 y por el proyecto CONACyT INFRA-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 142 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 2 días del mes de febrero del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	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.

Ma. Guadalupe Segura Covarrubias

sobre la Tesis intitulada:

Purificación, caracterización bioquímica y cristalización de la enzima XanA y dos variantes truncas en el extremo N-terminal

que se desarrolló bajo la dirección de

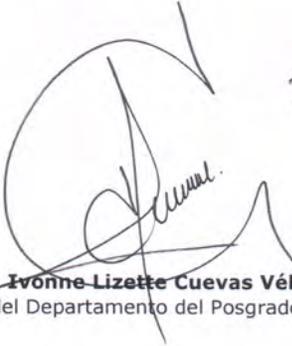
Dr. Samuel Lara González

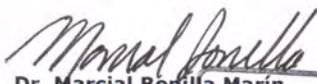
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:15 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 2 días del mes de febrero de 2016.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Borilla Marín
Secretario Académico



Dedicatoria

A mi familia

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. A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Gerardo Argüello Astorga, Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro por las aportaciones en la tesis.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	viii
Lista de esquemas	viii
Abreviaturas	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Resumen	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	
Diseño y construcción de las mutantes truncas de la enzima XanA de <i>A. nidulans</i> .	6
Clonación de XanA silvestre, XanA Δ 14 y XanA Δ 57 en el vector pET28-PPS.	6
Evaluación de la expresión y solubilidad de XanA silvestre, XanA Δ 14 y XanA Δ 57.	7
Purificación de XanA silvestre, XanA Δ 14 y XanA Δ 57.	8
Evaluación del estado monomérico a través del tiempo.	9
Experimentos de cristalización.	9
Ensayos de cinética enzimática.	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Modelado <i>in silico</i> y diseño de las proteínas XanA silvestre, XanA Δ 57 y XanA Δ 14.	11
Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína XanA y sus variantes truncas.	13
Purificación de la proteína XanA.	14
Estudios de cinética enzimática para la proteína XanA silvestre.	16
Cristalografía de proteínas : ensayo de cristalización de XanA silvestre.	18
CONCLUSIONES	20
Agradecimientos	21
BIBLIOGRAFÍA	21

Lista de figuras

<u>Figura 1.</u> Modelo de la estructura tridimensional de XanA y predicción de la estructura secundaria.	23
<u>Figura 2.</u> Purificación de la enzima XanA silvestre.	25
<u>Figura 3.</u> Evaluación del estado de agregación de XanA silvestre en el tiempo.	27
<u>Figura 4.</u> Seguimiento del estado monómero de la proteína XanA en MOPS.	28
<u>Figura 5.</u> Cinética enzimática de XanA silvestre en estado monómero.	29
<u>Figura 6.</u> Cristal de la proteína XanA.	32

Lista de esquemas

<u>Esquema 1.</u> Mecanismo secuencial bi bi ordenado.	31
---	----

Lista de figuras de material suplementario

<u>Figura Suplementaria 1.</u> Purificación de XanA con y sin xantina-CHAPS.	33
<u>Figura Suplementaria 2.</u> Escisión de la etiqueta 6XHis de XanA.	34

Abreviaturas

(Por sus siglas en inglés)

XanA	Xantina dioxigenasa dependiente de Fe ²⁺ y α-cetoglutarato.
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)- 1-propanesulfonate
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG	Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PPS	Prescission Protease
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
WT	Wild Type
α-CG	α-cetoglutarato
TauD	taurina/α-cetoglutarato dioxigenasa
Ni-NTA	Níquel- nitrilotriacetic acid
FeSO₄	Sulfato de hierro
kDa	Kilodaltons

Resumen

“Purificación, caracterización bioquímica y cristalización de la enzima XanA y dos variantes truncas en el extremo N-terminal”

En el metabolismo de las purinas la degradación de xantina a ácido úrico es mediada por la enzima xantina oxidasa. Sin embargo, en el 2005 se describió una nueva vía de degradación alternativa en *Aspergillus nidulans* mediada por la enzima xantina dioxigenasa dependiente de Fe^{2+} y α -cetoglutarato (α -CG, XanA). Esta vía, es exclusiva de hongos como *A. clavatus*, en algunas levaduras como *C. albicans*, *S. pombe* y en los géneros *Penicillium* y *Taleromyces*, entre otros. XanA es una enzima de 370 residuos de aminoácidos y 41.3 kDa, que presenta un identidad del 18% con la enzima taurina/ α -CG dioxigenasa (TauD). El mecanismo catalítico de XanA aún no ha sido descrito y dentro del grupo de las hidroxilasas dependientes de Fe^{2+} y α -CG, es la única capaz de hidroxilar una purina libre. La estructura tridimensional de la enzima XanA aún no ha sido reportada, por lo tanto el objetivo de este trabajo es caracterizar y cristalizar la proteína XanA. La proteína fue expresada en la cepa BL21 (DE3) Star de *E.coli* utilizando 0.4 mM de IPTG. La enzima se purificó en dos etapas, IMAC y filtración en gel, con un rendimiento final de 15 mg/L. Los estudios de cinética enzimática muestran que la enzima XanA silvestre es activa y su cinética se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten con una K_m para el α -CG de $97.9 \pm 13.9 \mu M$. Realizamos ensayos de cristalización con XanA silvestre (monomérica), y obtuvimos una aproximación a las condiciones adecuadas para obtener cristales.

PALABRAS CLAVE: XanA, cristalización de proteínas, purificación de proteínas, modelado *in silico*.

Abstract

“Purification, biochemical characterization and crystallization of XanA enzyme and two variants truncated at the N-terminus”

In the metabolism of purines, degradation of xanthine to uric acid is mediated by the enzyme xanthine oxidase. However, in 2005, a novel mechanism for xanthine metabolism was discovered, this mechanism is mediated by the enzyme xanthine hydroxylase (XanA), which is Fe^{2+} and α -ketoglutarate-dependent. This pathway is exclusive of certain fungi as *A. clavatus*, in some yeast as *C. albicans*, *S. pombe* and in the genera *Penicillium* and *Taleromyces*, among others. XanA is an enzyme of 370 amino acids and 41.3 kDa, which presents an 18% identity with the enzyme taurine/ α -CG dioxygenase (TauD). The catalytic mechanism has not yet been described and it belongs to the group of the hydroxylases dependent on Fe^{2+} and α -ketoglutarate, XanA is the first enzyme described of this group that hydroxylates a free purine base. The three-dimensional structure of XanA enzyme has not yet been reported; therefore, the aim of this work was to characterize and crystallize the XanA protein. The protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) Star cells using 0.4 mM IPTG. Purification of the wild type enzyme was carried out in two steps, IMAC and size exclusion chromatography, with a final yield of 15 mg/L. Enzyme kinetics studies of XanA wild type enzyme show that the enzyme fits the Michaelis-Menten equation with a K_m of $97.9 \pm 13.9 \mu\text{M}$ for α -ketoglutarate. We perform crystallization trials with wild type XanA (monomeric), and obtained an approach to appropriate conditions to obtain crystals.

Key words: XanA, protein crystallization, protein purification, *in silico* modeling.

Purificación, caracterización bioquímica y cristalización de la enzima XanA y dos variantes truncas en el extremo N-terminal.

Segura-Covarrubias M.G.¹ , Lara-González S^{1*}

¹ Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4 sección CP. 78216

***Autor de correspondencia:** Samuel Lara-González,

Correo electrónico: samuel.lara@ipicyt.edu.mx

Título corto: Purificación y caracterización de XanA

Palabras clave: XanA, cristalización de proteínas, purificación de proteínas, modelado *in silico* .

Resumen

“Purificación, caracterización bioquímica y cristalización de la enzima XanA y dos variantes truncas en el extremo N-terminal”

En el metabolismo de las purinas la degradación de xantina a ácido úrico es mediada por la enzima xantina oxidasa. Sin embargo, en el 2005 se describió una nueva vía de degradación alternativa en *Aspergillus nidulans* mediada por la enzima xantina dioxigenasa dependiente de Fe^{2+} y α -cetoglutarato (α -CG, XanA). Esta vía, es exclusiva de hongos como *A. clavatus*, en algunas levaduras como *C. albicans*, *S. pombe* y en los géneros *Penicillium* y *Taleromyces*, entre otros. XanA es una enzima de 370 residuos de aminoácidos y 41.3 kDa, que presenta un identidad del 18% con la enzima taurina/ α -CG dioxigenasa (TauD). El mecanismo catalítico de XanA aún no ha sido descrito y dentro del grupo de las hidroxilasas dependientes de Fe^{2+} y α -CG, es la única capaz de hidroxilar una purina libre. La estructura tridimensional de la enzima XanA aún no ha sido reportada, por lo tanto el objetivo de este trabajo es caracterizar y cristalizar la proteína XanA. La proteína fue expresada en la cepa BL21 (DE3) Star de *E.coli* utilizando 0.4 mM de IPTG. La enzima se purificó en dos etapas, IMAC y filtración en gel, con un rendimiento final de 15 mg/L. Los estudios de cinética enzimática muestran que la enzima XanA silvestre es activa y su cinética se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten con una K_m para el α -CG de $97.9 \pm 13.9 \mu\text{M}$. Realizamos ensayos de cristalización con XanA silvestre (monomérica), y obtuvimos una aproximación a las condiciones adecuadas para obtener cristales.

PALABRAS CLAVE: XanA, cristalización de proteínas, purificación de proteínas, modelado *in silico*.

INTRODUCCIÓN

La vía mejor conocida para la degradación de la xantina está mediada por las enzimas xantina oxidasa o bien xantina deshidrogenasa, estas enzimas participan en la vía metabólica de las purinas, transformando la xantina a ácido úrico mientras transfieren electrones a NAD^+ en el caso de la xantina deshidrogenasa, o bien, al oxígeno en el caso de la xantina oxidasa (EG, 1939, Enroth *et al.*, 2000). A estas enzimas también se les llama xantina hidroxilasas y están altamente conservadas en muchos organismos como arqueas, bacterias, hongos, plantas y metazoos (Dixon, 1926). En su estructura, estas enzimas presentan un dominio de unión a Fe^{2+} y un dominio de unión a FAD u oxígeno, además de un sitio de unión para el cofactor de molibdeno (MOCO, formado entre la molibdoterina y un óxido de molibdeno). Ambas enzimas son altamente dependientes del cofactor MOCO, ya que en su ausencia son totalmente inactivas (Choi *et al.*, 2004, Eger *et al.*, 2000).

En el 2005 tras varios estudios en los cuales se eliminaron los genes *hxA*, *cnx* y *hxB* de *Aspergillus nidulans* que participan en la síntesis de xantina oxidasa y del cofactor MOCO, se observó que las mutantes conservaban la capacidad de crecer en xantina como única fuente de nitrógeno, esto llevó a proponer la existencia de una vía alternativa para el catabolismo de xantina (Cultrone *et al.*, 2005, Simmons *et al.*, 2008). En trabajos posteriores se determinó que esta vía alternativa está mediada por la enzima XanA, cuyo gen se localizó en el cromosoma VIII de *A. nidulans*. Esta proteína tiene una secuencia de 370 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 41.30 kDa (Cultrone *et al.*, 2005).

Con base en un análisis de secuencia se observó que la proteína XanA muestra similitud con la enzima taurina/ α -cetoglutarato dioxigenasa (TauD), la cual participa en la producción de sulfato como fuente de azufre a través de la degradación de taurina en *E. coli*. Ambas proteínas pertenecen al grupo de metaloproteínas dependientes de Fe^{2+} / α -cetoglutarato y comparten entre sí una identidad global del 18%, mientras que en el núcleo catalítico presentan 33% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Hausinger, 2004). Dadas estas

similitudes se propuso un mecanismo de reacción para XanA, similar al descrito para TauD (Cultrone *et al.*, 2005).

En trabajos posteriores realizados por Montero-Morán y colaboradores (Montero-Moran *et al.*, 2007) se realizó un estudio comparativo entre las proteínas recombinantes 6XHis-XanA purificadas de *A. nidulans* y de *E. coli* respectivamente. La comparación de 6XHis-XanA proveniente de ambos organismos reveló diferencias fisicoquímicas importantes, por ejemplo el estado de agregación es distinto: la proteína obtenida a partir del hongo es un dodecámero, mientras que la proteína extraída de la bacteria es un monómero; adicionalmente existen modificaciones postraduccionales que ocurren sólo en la proteína extraída a partir del hongo. Sin embargo, son muy parecidas enzimáticamente ya que las constantes cinéticas son muy cercanas, por ejemplo la constante de afinidad por xantina es $\sim 45 \mu\text{M}$ en ambas proteínas y la constante catalítica para la proteína extraída del hongo es 30 s^{-1} y en el caso de la proteína extraída de la bacteria es 70 s^{-1} . En ese mismo trabajo se describió la posible presencia de una secuencia señal de aproximadamente 60 aminoácidos en la proteína purificada a partir de *A. nidulans* la cual se propone es eliminada del extremo N-terminal (Montero-Moran *et al.*, 2007).

La xantina α -cetoglutarato dioxigenasa es una enzima mononuclear Fe (II) no hemo, que descarboxila α -CG a succinato mientras hidroxila xantina para generar ácido úrico. En ausencia de una estructura tridimensional de XanA y utilizando un modelo por homología, Meng Li y colaboradores identificaron aminoácidos implicados en la unión a Fe (II) (Asp151, His149 y His340), en la unión a α -CG (Arg352 y Lys122) y en la unión a xantina (Asn358, Gln356, Asp138 y Glu137), esto mediante la caracterización enzimática de mutantes sitio específicas (Li *et al.*, 2008).

Recientemente se determinó que en *A. nidulans*, XanA se localiza en el citosol, usando una fusión de XanA con la proteína GFP, evaluada mediante microscopia de fluorescencia, en este trabajo también se localizó en el citosol a la enzima xantina deshidrogenasa, lo que indica que tanto XanA como la xantina

deshidrogenasa presentan la misma localización celular, además comparten la ubicación subcelular en esporofitos e hifas vegetales (Galanopoulou *et al.*, 2014). Basados en lo expuesto anteriormente y debido a que no se cuenta con estructura tridimensional de XanA, el objetivo de este trabajo fue clonar, solubilizar, purificar, caracterizar y cristalizar la enzima XanA silvestre y dos variantes truncas en el extremo N-terminal. Para ello se hicieron tres construcciones, dos de ellas truncas en el extremo N-terminal, las cuales fueron clonadas en el vector pET28-PPS y expresadas en *E. coli* BL21 (DE3) Star. Tras el uso de diversos aditivos con el fin de solubilizar las proteínas, se observó que en presencia de CHAPS y xantina (sustrato) la proteína XanA silvestre aparece en la fracción soluble. Por otro lado, se estandarizó el método de purificación en dos etapas utilizando IMAC y Exclusión Molecular. Esto nos permitió obtener el estado monómero de XanA silvestre. Además, se llevaron a cabo ensayos preliminares para la caracterización enzimática lo que indicó que la proteína es activa. Finalmente, se realizaron ensayos de cristalización de proteínas con la finalidad de obtener cristales y determinar la estructura tridimensional por difracción de rayos X.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y construcción de las mutantes truncas de la enzima XanA de *A. nidulans*.

Se utilizó el programa I-TASSER (Roy *et al.*, 2010) para construir un modelo tridimensional de la proteína XanA por el método conocido como “threading”, para lo cual se tomó la secuencia de XanA (GI: 67763579) y se ingresó al servidor usando el modo automático. Los resultados obtenidos se analizaron y se eligió el modelo con base al C-score con el valor más cercano a dos, y al TM-score con el valor mas cercano a uno, conforme a lo reportado (Zhang, 2008). El modelo resultante se manipuló con Chimera 1.7 (Pettersen *et al.*, 2004) .

Basándonos en el modelo estructural de XanA se diseñaron dos mutantes truncas en el extremo N-terminal, tomando en cuenta la exposición de esta región al solvente así como su interacción con el núcleo de la proteína. En una de estas mutantes se eliminan los primeros 14 aminoácidos (a partir de ahora llamada XanA Δ 14). La otra mutante carece de los primeros 57 aminoácidos (a partir de ahora llamada XanA Δ 57).

Para la elaboración de las construcciones moleculares se diseñaron los siguientes oligonucleótidos :

XanA Δ 14 : Δ 14 directo : 5'- gcaattccatatggggctgcaatcgacttcggtg-3' ,

XanA Δ 57 : Δ 57directo: 5' gcaattccatatgaccctaaagcgcaatgaactcac 3' ,

XanA silvestre: XanAdirecto: 5'gcaattccatatgccagccatcactgttaagcc 3'.

Se utilizó el siguiente oligonucleótido reverso para las tres construcciones:

XanAreverso: 5'- ccaagcttctactctctatacggcacaactcc-3'.

Los oligonucleótidos directos cuentan con el sitio de corte para la enzima de restricción *NdeI*, mientras que el oligonucleótido reverso tiene los sitios de corte para las enzimas *HindIII* y *BamHI*.

Clonación de XanA silvestre, XanA Δ 14 y XanA Δ 57 en el vector pET28.

Los 1113 pb, 1080 pb y 955 pb correspondientes al gen que codifica las enzimas XanA silvestre, XanA Δ 14 y XanA Δ 57 respectivamente, se amplificaron a partir de DNA plasmídico de XanA en el vector ThioC proporcionado por la Dra. Montero-

Morán. La mezcla de reacción para la amplificación de las mutantes truncas de XanA contenían 25 ng de DNA plasmídico (construcción XanATHioC (Montero-Moran *et al.*, 2007)), 10 μ M de los oligos mencionados en la sección anterior y se amplificó con la DNA Polimerasa Platinum *Pfx* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), la temperatura de alineamiento fue 55° C y se amplificó por 30 ciclos.

El producto de DNA purificado fue digerido con las enzimas *NdeI* y *HindIII* y ligado con la T4 DNA ligasa en el vector pET28-PPS, el cual tiene un sitio de corte para la PreScission Preotease (PPS). Las clonas identificadas como positivas fueron confirmadas por ensayos de restricción enzimática, así como por PCR de colonia y finalmente todas las construcciones fueron secuenciadas con el método de dideoxinucleótidos marcados, utilizando los oligonucleótidos externos T7.

Evaluación de la expresión y solubilidad de XanA silvestre, XanA Δ 14 y XanA Δ 57.

Para evaluar la expresión, las tres construcciones se transformaron por choque térmico en las cepas BL21-(DE3), BL21-(DE3) Star, BL21-(DE3) GroEL-GroES y Rosetta II (DE3) con el plásmido pET28-PPS-XanA silvestre, pET28-PPS-XanA Δ 14 y pET28-PPS-XanA Δ 57 por separado y se sembraron en agar suplementado con el antibiótico correspondiente. Una colonia se usó para inocular 10 mL de medio LB durante toda la noche, 5 mL de este cultivo se utilizaron para inocular 50 mL del cultivo LB, el cuál se creció a 37° C hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.6 – 0.8. La expresión heteróloga se indujo añadiendo IPTG a una concentración final de 0.4 mM y se incubó en agitación a 37° C por 4 horas. Se tomó una muestra de 1 mL antes de agregar el agente inductor y otra muestra al final de la inducción. Estas muestras se evaluaron cualitativamente por SDS-PAGE y posteriormente por densitometría.

Para evaluar la solubilidad se hicieron diferentes pruebas en la fase de expresión heteróloga variando temperaturas de inducción, probando 16, 18, 28 y 37 °C. En la fase del lisado celular se probaron diferentes amortiguadores como Tris-HCl a una concentración de 100 mM y a los siguientes valores de pH: 7.5, 8 y 8.5, también se probó el amortiguador MOPS 50 mM a pH 8, así como HEPES 20 mM a un pH 7.5. Los aditivos que se probaron fueron NaCl a las concentraciones de 100, 300 y

500 mM, Tritón X-100 a concentraciones de 0.2%, 0.5 % y 1%, CHAPS a concentraciones de 0.2%, 0.5% y 1%. Los sustratos que se evaluaron fueron la Xantina a las concentraciones de 200 y 400 μM , así como FeSO_4 a la concentración de 40 μM . Las células de cada condición fueron lisadas por sonicación. Se tomó una muestra de 100 μL del lisado celular en cada prueba y se centrifugó a 13000 rpm durante cinco minutos; el pellet y el sobrenadante se separaron y evaluaron por SDS-PAGE.

Purificación de XanA silvestre, XanA Δ 14 y XanA Δ 57.

Escherichia coli BL21 (DE3) Star fue transformada por choque térmico con los plásmidos pET28-PPS-XanA silvestre, pET28-PPS XanA Δ 57 y pET28-PPS-XanA Δ 14 por separado y se sembraron en agar suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Kanamicina. Una colonia se usó para crecer 50 mL de medio LB (Luria Broth) suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de kanamicina durante toda la noche, 20 mL de este cultivo se usaron para inocular 500 mL del medio LB suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ kanamicina, el cual se creció a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600}) de 0.6-0.8. La expresión heteróloga se indujo añadiendo IPTG a una concentración final de 0.4 mM, el cultivo se incubó a 18 °C durante 16 horas en agitación constante. El cultivo bacteriano se lisó por sonicación en el siguiente amortiguador de lisis: 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.2 % CHAPS, 5 % Glicerol, 400 μM Xantina y 20 mM de imidazol y posteriormente fue centrifugado a 8000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La fracción soluble se recuperó, filtró (0.45 μm) y se inyectó a 3 mL de agarosa Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada con amortiguador de lisis. El primer lavado de la columna consistió en 10 CV (volúmenes de columna) de amortiguador de lisis, el segundo lavado consistió en 5 CV de amortiguador de lisis suplementado con 40 mM de imidazol. Las proteínas eluyeron con 4 CV del siguiente amortiguador: 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.2 % CHAPS, 5 % Glicerol, 400 μM Xantina y 250 mM de imidazol, todas las fracciones se analizaron por SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. Las fracciones que contenían la proteína de interés se rescataron para continuar con el proceso de purificación.

La etiqueta de histidina (6XHis) de las proteínas se removió mediante la incubación con 5 unidades/mL de la proteasa PPS a 4 °C durante toda la noche, el corte fue evaluado por SDS-PAGE. Posteriormente la muestra se concentró por ultrafiltración hasta 6 -7 mg/mL en un volumen final de 2 mL.

El segundo paso de purificación se realizó usando una columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) equilibrada con el siguiente amortiguador: 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.2% CHAPS, 0.4 mM Xantina y 2 mM β -mercaptoetanol. La muestra concentrada se inyectó y corrió a un flujo de 0.7 mL/min, se colectaron fracciones de 1 mL. Las fracciones que contenían la proteína de interés fueron identificadas a 280 nm durante la cromatografía y después analizadas en geles SDS-PAGE y cuantificadas por el método de absorbancia de aminoácidos aromáticos a 280 nm usando el coeficiente de extinción molar teórico $\epsilon_{280} = 42860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y se almacenaron a 4° C para experimentos posteriores.

La columna Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) se calibró previamente con un estándar de peso molecular para filtración en gel (Bio-Rad). El estándar contiene una mezcla de proteínas globulares de peso molecular conocido, tiroglobulina (670 kDa), γ -globulina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) y vitamina B₁₂ (1,350 kDa).

Evaluación del estado monomérico a través del tiempo.

El monómero purificado conforme a la sección descrita anteriormente, se analizó inyectando 500 μ l de muestra a una concentración de 0.1 mg/mL a los 1, 2, 5 y 7 días posteriores a la purificación, el amortiguador de corrida fue 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 300 mM NaCl, 0.2% CHAPS, 0.4 mM de xantina y 2 mM β -mercaptoetanol.

Para los ensayos de cinética enzimática se siguió un protocolo similar, en este caso el monómero fue purificado y desalado en un amortiguador que contiene 50 mM MOPS, 300 mM NaCl, se inyectó a las 0, 2, 4, 6, 8 y 16 horas en una columna Superdex 75.

Experimentos de cristalización.

Las pruebas de cristalización se realizaron con XanA silvestre a una concentración de 10 mg/mL utilizando la matriz de condiciones de cristalización de Hampton Research (Kit Cristal Screen I y II). El método de cristalización fue por difusión de vapor en gota sentada. Para cada condición se usaron 150 μ L de precipitante y las gotas se colocaron en proporción 1:1 (1 μ L de proteína y 1 μ L de precipitante), las cajas fueron selladas y almacenadas a 16° C. El experimento de cristalización se monitoreó en el microscopio estereoscópico durante 6 semanas. Al término de 42 días aquellas condiciones que mostraron precipitados se diluyeron agregando 150 μ L de agua al pozo del precipitante, dichas condiciones se sellaron nuevamente y se monitorearon por 3 semanas. Se realizaron experimentos similares a 4, 6, 8 y 12 mg/mL, para un total de 400 condiciones.

Ensayos de cinética enzimática.

La actividad se midió en equilibrio rápido a 25° C utilizando las siguientes condiciones: 40 μ M FeSO₄, 200 μ M Xantina, 50 mM MOPS pH 7.4, 1 μ M XanA (estado monómero) variando la concentración del sustrato, α -CG de 15 a 500 μ M. Se monitoreó la absorbancia a 294 nm para evaluar la producción de ácido úrico ($\epsilon = 12200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las unidades de la actividad fueron definidas como micromoles de ácido úrico producidos por minuto, y la actividad específica se midió como micromoles por minuto por miligramo de proteína pura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modelado *in silico* y diseño de las proteínas XanA silvestre, XanA Δ 57 y XanA Δ 14.

I-TASSER (Iterative threading assembly refinement) es una plataforma integrada para la predicción automatizada de estructuras y función de proteínas, basada en el paradigma secuencia-a-estructura-a-función. A partir de una secuencia de aminoácidos I-TASSER primero genera “threading” esto se refiere a un procedimiento de bioinformática para identificar proteínas que son usadas como plantillas, provenientes de bases de datos de estructuras resueltas que tiene una estructura o un motivo estructural similar a la secuencia de consulta, la calidad del alineamiento se evalúa mediante el parámetro Z-score. El segundo paso que lleva a cabo I-TASSER consiste en hacer un montaje estructural de las secuencias que presentan un buen alineamiento, posteriormente, las regiones que no tienen un buen alineamiento se alinean a las que sí lo tienen y se hace una reducción de entropía a los modelos generados obteniendo un modelo de la proteína de consulta. La tercera etapa consiste en hacer un refinamiento de todos los residuos del modelo con la finalidad de eliminar los choques estéricos y además para refinar la topología general de cada carbono alfa. Finalmente, la cuarta etapa consiste en crear anotaciones funcionales basadas en la estructura, en esta etapa se hace coincidir estructuralmente los modelos 3D predichos contra una biblioteca de proteínas con estructura y función conocidas. El modelo tridimensional de la proteína de consulta se evalúa mediante los parámetros C-score que es una puntuación de confianza para la estimación de la calidad de los modelos predichos y TM-score que es un parámetro que mide la similitud estructural entre el modelo generado y proteínas resueltas similares, en donde los parámetros como C-score está típicamente en el rango de -5 a 2 y TM-score debe ser de 0.5 a 1 (Zhang, 2008, Roy *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2013).

La secuencia de 370 aminoácidos de la proteína XanA se cargó al servidor web de I-TASSER y se seleccionó el método automático para generar el modelo. El número de Id fue 5125162, como resultado se obtuvieron 5 modelos con diferentes C-score : -0.24, -1.73, -1.37, - 1.50, -1.49. En este caso se tomó el

modelo 1 que tuvo un C- score de -0.24, y el TM-score: 0.68 ± 0.12 , TM-score mide la similitud entre la estructura del modelo creado y la estructura de la proteína más parecida de la base de datos y es menos sensible a las variaciones estructurales locales; TM-score >0.5 nos indica que hay dos estructuras con topología similar, sin embargo un TM- score <0.5 nos indica que la similitud es al azar. Dado que en este caso TM-score fue de 0.68 se concluyó que la similitud no es al azar. La correlación de RMSD con el C-score no es tan fuerte como la del TM-score. Muchos modelos de alto C-score tienen un elevado RMSD. Esto es principalmente debido a la definición de RMSD que promedia las distancias de todos los pares de residuos con un peso igual. Por lo tanto, una diferencia local de modelado resulta en un valor alto RMSD incluso cuando la topología global es correcta. En el caso del TM-Score las distancias más pequeñas de los átomos son ponderadas fuertemente a diferencia de las distancias más grandes, lo cual hace que el score sea insensible a un error local durante el modelado.

En la Figura 1 panel A se muestra el modelo obtenido para la proteína XanA, se observan de diferentes colores los residuos que se ha demostrado están altamente conservados en el sitio catalítico de la proteína (Li *et al.*, 2008). En el extremo N-terminal se observa una secuencia de aproximadamente 58 residuos de aminoácidos que parecieran no formar parte de la estructura globular de la proteína. Esta observación concuerda con la propuesta hecha por Montero Morán y colaboradores en 2007 de que la proteína presenta una secuencia señal (Montero-Moran *et al.*, 2007), que comprende los primeros 60 residuos; esto también coincide con el resultado del predictor de péptido señal Signal-BLAST (Frank & Sippl, 2008) el cual predice un corte en el residuo Gln 53. Tomando en cuenta esta información decidimos generar dos construcciones que nos permitieran eliminar regiones potencialmente flexibles (péptido señal) y obtener una proteína más “globular”, esto con el objetivo de favorecer el proceso de nucleación y por ende la formación de cristales de proteína.

La producción de proteínas solubles en cantidades adecuadas para estudios estructurales ha sido un cuello de botella común en biología estructural y en la genómica estructural por igual. El diseño de construcciones truncas es una

estrategia que se usa con frecuencia en estudios de biología estructural, ya que esto permite la obtención de construcciones específicas con una alta propensión a cristalizar lo que para los estudios de cristalografía de rayos X es una meta adicional (Mooij *et al.*, 2009, Alzari *et al.*, 2006). El diseño de las construcciones truncas se basa en análisis bioinformático, o por ejemplo, determinadas por proteólisis y analizadas por espectrometría de masas, o bien software computacionales como ProteínaCCD. Este último tiene como objetivo facilitar el diseño de varias construcciones truncas de la proteína a analizar, a partir de datos experimentales o de las herramientas de análisis de secuencias.

En el caso de la construcción XanA Δ 57 se eliminaron 57 residuos (**Figura 1 panel B**), de los cuales se perdieron tres láminas- β y dos posibles α -hélices según la predicción de estructura secundaria hecha por PSIPRED (Buchan *et al.*, 2013). Por su parte, en la construcción XanA Δ 14 se eliminaron 14 residuos en el amino terminal, en este caso sólo se elimina una posible hoja β (1β) (**Figura 1 panel B**).

Evaluación de la expresión y solubilidad de la proteína XanA y sus variantes truncas.

La expresión de las construcciones XanA silvestre, XanA Δ 14 y XanA Δ 57 se evaluó inicialmente en las siguientes cepas: BL21 (DE3), BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) GroEL-GroES, Rosetta II (DE3) mediante densitometría con el software ImageJ de geles SDS-PAGE, en donde se observó que ninguna de las tres construcciones en la cepa Rosetta II (DE3) muestran expresión, y las cepas BL21 (DE3) así como BL21 (DE3) GroEL-GroES muestran una expresión menor (20% menos) comparado con la cepa BL21 (DE3) Star (resultados no mostrados). De acuerdo a los resultados obtenidos se eligió a la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Star, esta cepa tiene una mutación en el gen de la RNAasa E (*rne131*) que reduce los niveles de RNAsas endógenas y la degradación del ARNm, aumentando así la estabilidad de los transcritos de ARNm y el aumento de rendimiento de proteína, por lo que ofrece una elevada expresión de proteína recombinante a partir de plásmidos que utilizan el sistema T7 como son los plásmidos tipo pET.

Una vez seleccionada la cepa, se evaluó la solubilidad utilizando varios amortiguadores como Tris y MOPS, así como distintos detergentes (Tritón X-100 y

CHAPS), concentraciones de sal (NaCl) y sustratos (Xantina y FeSO₄), con la finalidad de obtener una buena parte de la proteína en la fracción soluble.

Nuestros resultados densitométricos muestran que las construcciones XanA silvestre y XanAΔ57 se expresan mejor en las células BL21 (DE3) Star y se extrae una mayor proporción en la fracción soluble usando el siguiente amortiguador :100 mM de Tris pH 7.8, 300 mM de NaCl, 0.5% CHAPS, 400 μM Xantina, 2 mM β-mercaptoetanol y 5% glicerol. En el caso de la construcción XanAΔ14 no ha sido posible obtenerla de forma soluble.

Se ha demostrado que los detergentes pueden tener un papel importante en los procesos de solubilidad, purificación y cristalización de proteínas (Hjelmeland *et al.*, 1983) principalmente de membrana, como por ejemplo los receptores serotoninérgicos 1^a para los cuales la presencia del CHAPS fue crítica para la solubilidad de dicho receptor (Kalipatnapu & Chattopadhyay, 2005). Por lo tanto, basándonos en dichas referencias utilizamos el detergente CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)- 1-propanesulfonate), que es un compuesto especialmente útil en la purificación de proteínas ya que se utiliza como disolvente no desnaturizante. CHAPS también se puede utilizar en conjunto con otros detergentes tales como Tritón X-100 (Hjelmeland *et al.*, 1983).

En este trabajo observamos claramente que al incluir xantina y CHAPS en el proceso de purificación se promueve una mayor solubilidad así como un aumento en el rendimiento (**Figura S1 material suplementario**).

Purificación de la proteína XanA.

El primer paso de purificación fue utilizando la técnica de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado. Los resultados observados para la proteína XanA silvestre muestran que esta proteína eluyó en cuatro fracciones de 3 mL a 250 mM de imidazol (**Figura 2 panel A**). Estas fracciones se evaluaron por SDS-PAGE. Las fracciones se concentraron por ultrafiltración hasta un volumen de 2 mL y una concentración final de 7 mg/mL. Posteriormente se incubó con la proteasa PPS para eliminar la etiqueta 6XHis y se evaluó por SDS-PAGE, donde se observó claramente la escisión de la etiqueta 6XHis, con la disminución del peso molecular de la proteína XanA (**Figura S2 material suplementario**). Un punto clave para

lograr dicha concentración de proteína fue el uso del aditivo CHAPS, así como el sustrato xantina, ya que fueron indispensables para obtener la proteína soluble, además permitieron la concentración de ésta evitando la precipitación. El efecto del CHAPS y de la xantina durante la purificación se pueden observar al comparar estos resultados con experimentos previos en ausencia de CHAPS y xantina, en los que se obtienen un rendimiento final de 3 mg/L a una concentración máxima de 1.52 mg/mL (**Figura S1 material suplementario**).

El segundo paso de purificación fue utilizando la técnica de cromatografía por exclusión molecular en la cual se inyectó la muestra proveniente del paso anterior en una columna Superdex 200. El cromatograma resultante muestra el seguimiento de las proteínas a una absorbancia de 280 nm, en el cuál se observa el perfil de elución con un pico en el mililitro 8-9 correspondiente a un agregado de alto peso molecular, además se observa un pico en el mililitro 15-16 correspondiente al monómero de XanA (**Figura 2 panel B**). Las fracciones correspondientes a los mL 15 y 16 se juntaron y se concentraron por ultrafiltración hasta un volumen final de 500 μ L y una concentración de 15 mg/mL.

El perfil de elución es reproducible en el siguiente amortiguador 100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.2% CHAPS, 200 μ M xantina y 2 mM β -mercaptoetanol. Para calcular el peso molecular de las fracciones que eluyeron de la columna, se realizó un análisis de regresión lineal a la curva de calibración, en donde se interpoló el volumen de elución de XanA, con lo cuál se obtuvo una masa de 41.53 kDa (**Figura 2 panel B**), que corresponde a un monómero.

Para cristalografía de proteínas es necesario tener una muestra mono dispersa, puesto que esto favorece la nucleación. Por lo tanto, ya que se observó que la proteína XanA una vez purificada por IMAC presenta diferentes estados oligoméricos (polidispersidad). Primero se aisló el estado monomérico usando la cromatografía por exclusión molecular y posteriormente se evaluó el tiempo en el que el monómero aislado permanece sin formar agregados de alto peso molecular. Determinamos que XanA silvestre en estado monomérico es estable en dicha conformación hasta por 7 días, siempre y cuando se mantenga a una temperatura de 4° C y en el siguiente amortiguador: 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 300

mM NaCl, 0.2 % CHAPS, 200 μ M Xantina y 2 mM β -mercaptoetanol. Esto se determinó al inyectar 500 μ l de XanA silvestre en estado monomérico al día 1, 2, 5 y 7 posterior a su purificación (**Figura 3**).

En el caso de la proteína XanA Δ 57 se sigue trabajando en la estandarización del proceso de solubilidad y purificación por IMAC, ya que no se ha logrado obtener más de 0.4 mg/L que es 35 veces menor comparado con la versión silvestre.

En estudios previos sólo se ha purificado XanA por IMAC con un rendimiento de 5 mg/L (Montero-Moran *et al.*, 2007) lo que es menor a los 15 mg/L obtenidos en este trabajo. Además, en este trabajo se incluyó una etapa de purificación por exclusión molecular que resultó ser muy eficiente ya que se obtiene proteína con mayor pureza, en estado monomérico, sin la etiqueta de histidinas y a una concentración final de hasta 15 mg/mL.

Estudios de cinética enzimática para la proteína XanA silvestre.

En trabajos anteriores se llevaron a cabo ensayos de cinética enzimática, en los cuales la enzima XanA se encontraba en amortiguador 50 mM MOPS a un pH de 7.4. Por tal motivo y para que nuestros resultados fueran comparables, en este trabajo también se usó MOPS como amortiguador en ensayos enzimáticos. Sin embargo, durante la purificación de la proteína XanA observamos la presencia de agregados de alto peso molecular lo que nos llevó a evaluar la permanencia del estado monomérico a través de un período de tiempo que permitiera realizar ensayos enzimáticos usando únicamente el monómero de XanA; como resultado obtuvimos que el monómero es estable como mínimo 8 horas a 4^o C en el amortiguador (50 mM de MOPS pH 7.4, 300 mM NaCl, y 0.2 % de CHAPS) (**Figura 4**).

Una vez aislada la proteína XanA como monómero se realizaron ensayos enzimáticos preliminares en condiciones de equilibrio rápido, se calculó la K_m para uno de los sustratos en este caso fue el α -cetoglutarato, cuya concentración se varió de 15 a 500 μ M, mientras que los demás sustratos permanecieron en concentraciones saturantes, se calculó la K_m desencadenando la reacción tanto con el sustrato α -cetoglutarato como con la enzima. Los resultados se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y se obtuvo una K_m para el de α -CG : $107.3 \pm$

17.2 μM (desencadenado con $\alpha\text{-CG}$) y de 94.5 ± 17.8 (desencadenando con XanA) (**Figura 5 panel A**). En experimentos previos evaluamos la actividad de la enzima XanA purificada únicamente por IMAC, en este caso los datos se ajustan a la ecuación de Hill con un $h=2$, lo que muestra cooperatividad.

Nuestros resultados actuales nos permiten explicar esta cooperatividad por la presencia de agregados en esa muestra parcialmente pura (**Figura 5 panel B**).

En otros trabajos ya se han realizado ensayos previos de cinética enzimática (Montero-Moran *et al.*, 2007) en los cuales a partir de la proteína XanA obtenida por IMAC y mediante la variación de los sustratos $\alpha\text{-CG}$ y xantina se obtuvieron datos que se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten. A diferencia de nuestros resultados, en dichos ensayos se obtuvieron la K_m de $\alpha\text{-CG} = 31.1 \pm 1.6 \mu\text{M}$ y la K_m de Xantina = $45.2 \pm 3.6 \mu\text{M}$. La K_m del $\alpha\text{-cetoglutarato}$ en nuestro trabajo es tres veces mayor comparada con la obtenida en el trabajo antes mencionado, esta diferencia puede deberse a que en el trabajo citado (Montero-Moran *et al.*, 2007), se caracterizó XanA purificada únicamente por IMAC, nuestros datos demuestran que en esas condiciones XanA presenta diferentes agregados. Nuestro valor de K_m para el $\alpha\text{-cetoglutarato}$ se calculó utilizando solo la fracción que corresponde a la forma monomérica de la enzima y sabemos que es estable como monómero en las condiciones experimentales utilizadas.

Otro parámetro importante obtenido en nuestros ensayos de cinética enzimática fue la V_{max} , esta se define como la velocidad a la cual todos los centros activos son incapaces de captar más sustrato. La comparación de las velocidades máximas entre las reacciones desencadenadas tanto por el sustrato como por la enzima, muestran una importante diferencia ya que cuando se desencadena con el sustrato la $V_{\text{max}} = 0.6859 \mu\text{moles}/\text{min}$ la cual es 2.3 veces mayor que la V_{max} de la reacción desencadenada con la enzima $V_{\text{max}} = 0.2955 \mu\text{moles}/\text{min}$, lo que indica que hay una mayor actividad de la enzima cuando se desencadena la reacción con el sustrato $\alpha\text{-cetoglutarato}$, (**Figura 5 panel A**). Esta evidencia nos lleva a proponer que el mecanismo de reacción de la proteína XanA es “secuencial bi bi ordenado”, este mecanismo se refiere a todo sistema cuyo mecanismo de reacción exija la unión con los dos sustratos antes de que pueda liberarse ningún

producto de la acción enzimática, es decir que A y B se combinan con la enzima en un orden determinado, por ejemplo sólo después de la unión de A a E (A es el primer sustrato y E la enzima), se une el sustrato B (B es el segundo sustrato), y la reacción sólo es eficaz si se tiene el complejo EAB. El mecanismo secuencial ordenado propuesto para XanA se muestra de manera general en el esquema 1. Hasta el momento se propone que el orden de entrada de los sustratos al sitio activo es el siguiente: xantina seguido de α -cetoglutarato, sin embargo no se ha determinado el orden de salida de los productos, por lo que se requiere de un mayor número de experimentos enzimáticos (Segel, 1975, Montero-Moran *et al.*, 2007) .

Cristalografía de proteínas : ensayo de cristalización de XanA silvestre.

Los ensayos de cristalización se realizaron mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada, para estos ensayos se empleó el método denominado matriz esparcida, que consiste en probar cientos de condiciones aleatorias hasta encontrar una que produzca cristales iniciales.

Hasta ahora se han montado un total de 480 condiciones variando la concentración de proteína en el intervalo 4 – 12 mg/mL. En las pruebas a 12 mg/mL de un total de 96 condiciones, en el 90% de las condiciones se observan precipitados, en el 10 % restante se observa la presencia de separación de fases lo que nos indica que estamos muy cerca de la concentración adecuada de proteína y precipitante para que se lleve a cabo la nucleación y con ello la formación de cristales. Con base en el diagrama de fases se llevó a cabo un experimento final el cual consistió en tomar 96 condiciones previamente montadas (3 meses de incubación a 16 °C) a una concentración de 10 mg/mL de XanA y se hizo una dilución del precipitante 1:1 con agua filtrada, esto con la finalidad de :

- Movernos del área de saturación al área de nucleación para promover la formación de núcleos cristalinos.
- Identificar las condiciones que producen precipitados cristalinos y que pueden optimizarse. Aquí se identificaron las condiciones 4, 16, 23, y 32 del kit Cristal Screen I y las condiciones 5, 25 y 40 del kit Cristal Screen II.

De las 96 condiciones probadas sólo en una se observó un cristal. La condición favorable es la número 39 del kit Crystal Screen 2 compuesta por 2% v/v Polyethylene glycol 400 y 2.0 M Sulfato de Amonio y 10 mg/mL de proteína XanA **(Figura 6)**. Ya que los cristales no son únicos, se buscara optimizar la condición que resultó favorable mediante las técnicas de seeding (Bergfors, 2003) y de matriz esparcida con el propósito de obtener más cristales y con formas geométricas definidas, que permitan su futuro análisis por difracción de rayos X.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se llevó a cabo la expresión, purificación y caracterización de la proteína XanA, proveniente del hongo *A. nidulans*. Esta proteína está presente únicamente en el reino de los hongos. Se demostró que esta enzima al ser expresada de manera recombinante requiere de aditivos tales como CHAPS y Xantina para ser soluble y posteriormente purificada. También se encontró que presenta agregados de alto peso molecular así como la conformación monomérica, por lo que es muy importante utilizar la cromatografía por exclusión molecular para lograr obtener el estado monomérico de XanA de manera homogénea, el cual es un requisito para ensayos de cristalografía de proteínas.

En cuanto a la caracterización de la proteína XanA, se determinó que el comportamiento enzimático es tipo Michaeliano y además se propuso que la proteína XanA presenta un mecanismo secuencial ordenado, ya que se observó un incremento en la V_{max} al desencadenar la reacción con uno de los sustratos en comparación con cuando se desencadena la reacción con la enzima. Como era de esperarse la K_m para uno de los sustratos (α -CG) es similar en ambos casos. Este es el primer estudio que propone el mecanismo secuencial ordenado para la enzima XanA; sin embargo, es importante llevar a cabo un número mayor de experimentos con sus respectivos triplicados, para corroborar la propuesta de dicho mecanismo.

Finalmente, en este trabajo se obtuvo una condición de cristalización en la cual se observan cristales, si bien estos cristales no son únicos, nos proporciona un buen punto de partida para buscar la optimización de condiciones usando otras técnicas de cristalografía de proteínas como “seeding” y matriz esparcida.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACyT No CB2011-168710 y por el proyecto CONACyT INFRA-2013-01 No 204373. (CB), agradecemos a la Dra. Gabriela Montero Moran y al Dr. José G. Sampedro por el apoyo en la parte de cinética enzimática.

BIBLIOGRAFÍA

- Alzari, P.M., H. Berglund, N.S. Berrow, E. Blagova, D. Busso, C. Cambillau, V. Campanacci, E. Christodoulou, S. Eiler, M.J. Fogg, G. Folkers, A. Geerlof, D. Hart, A. Haouz, M.D. Herman, S. Macieira, P. Nordlund, A. Perrakis, S. Quevillon-Cheruel, F. Tarandeu, H. van Tilbeurgh, T. Unger, M.P. Luna-Vargas, M. Velarde, M. Willmanns & R.J. Owens, (2006) Implementation of semi-automated cloning and prokaryotic expression screening: the impact of SPINE. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **62**: 1103-1113.
- Bergfors, T., (2003) Seeds to crystals. *Journal of structural biology* **142**: 66-76.
- Buchan, D.W., F. Minnici, T.C. Nugent, K. Bryson & D.T. Jones, (2013) Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic acids research* **41**: W349-357.
- Celej, M.S., G.G. Montich & G.D. Fidelio, (2003) Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility. *Protein science : a publication of the Protein Society* **12**: 1496-1506.
- Choi, E.Y., A.L. Stockert, S. Leimkuhler & R. Hille, (2004) Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *Journal of inorganic biochemistry* **98**: 841-848.
- Cultrone, A., C. Scazzocchio, M. Rochet, G. Montero-Moran, C. Drevet & R. Fernandez-Martin, (2005) Convergent evolution of hydroxylation mechanisms in the fungal kingdom: molybdenum cofactor-independent hydroxylation of xanthine via alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Molecular microbiology* **57**: 276-290.
- Dixon, M., (1926) Studies on Xanthine Oxidase: The Specificity of the System. *The Biochemical journal* **20**: 703-718.
- EG, B., (1939) Xanthine oxidase: purification y properties *The Journal of biological chemistry* **128**: 51-67.
- Eger, B.T., K. Okamoto, C. Enroth, M. Sato, T. Nishino, E.F. Pai & T. Nishino, (2000) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase isolated from bovine milk. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **56**: 1656-1658.
- Enroth, C., B.T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, T. Nishino & E.F. Pai, (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10723-10728.
- Frank, K. & M.J. Sippl, (2008) High-performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques. *Bioinformatics* **24**: 2172-2176.

- Galanopoulou, K., C. Scazzocchio, M.E. Galinou, W. Liu, F. Borbolis, M. Karachaliou, N. Oestreicher, D.G. Hatzinikolaou, G. Diallinas & S. Amillis, (2014) Purine utilization proteins in the Eurotiales: cellular compartmentalization, phylogenetic conservation and divergence. *Fungal genetics and biology : FG & B* **69**: 96-108.
- Hausinger, R.P., (2004) Metabolic versatility of prokaryotes for urea decomposition. *Journal of bacteriology* **186**: 2520-2522.
- Hjelmeland, L.M., W.A. Klee & J.C. Osborne, Jr., (1983) A new class of nonionic detergents with a gluconamide polar group. *Analytical biochemistry* **130**: 485-490.
- Kalipatnapu, S. & A. Chattopadhyay, (2005) Membrane protein solubilization: recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors. *IUBMB life* **57**: 505-512.
- Li, M., T.A. Muller, B.A. Fraser & R.P. Hausinger, (2008) Characterization of active site variants of xanthine hydroxylase from *Aspergillus nidulans*. *Archives of biochemistry and biophysics* **470**: 44-53.
- Montero-Moran, G.M., M. Li, E. Rendon-Huerta, F. Jourdan, D.J. Lowe, A.W. Stumpff-Kane, M. Feig, C. Scazzocchio & R.P. Hausinger, (2007) Purification and characterization of the FeII- and alpha-ketoglutarate-dependent xanthine hydroxylase from *Aspergillus nidulans*. *Biochemistry* **46**: 5293-5304.
- Mooij, W.T., E. Mitsiki & A. Perrakis, (2009) ProteinCCD: enabling the design of protein truncation constructs for expression and crystallization experiments. *Nucleic acids research* **37**: W402-405.
- Petterson, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng & T.E. Ferrin, (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* **25**: 1605-1612.
- Roy, A., A. Kucukural & Y. Zhang, (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* **5**: 725-738.
- Segel, I., (1975) *Enzyme kinetics, behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. Wiley-Interscience, p. 982.
- Simmons, J.M., T.A. Muller & R.P. Hausinger, (2008) Fe(II)/alpha-ketoglutarate hydroxylases involved in nucleobase, nucleoside, nucleotide, and chromatin metabolism. *Dalton transactions*: 5132-5142.
- Yang, J., A. Roy & Y. Zhang, (2013) Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics* **29**: 2588-2595.
- Zhang, Y., (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics* **9**: 40.

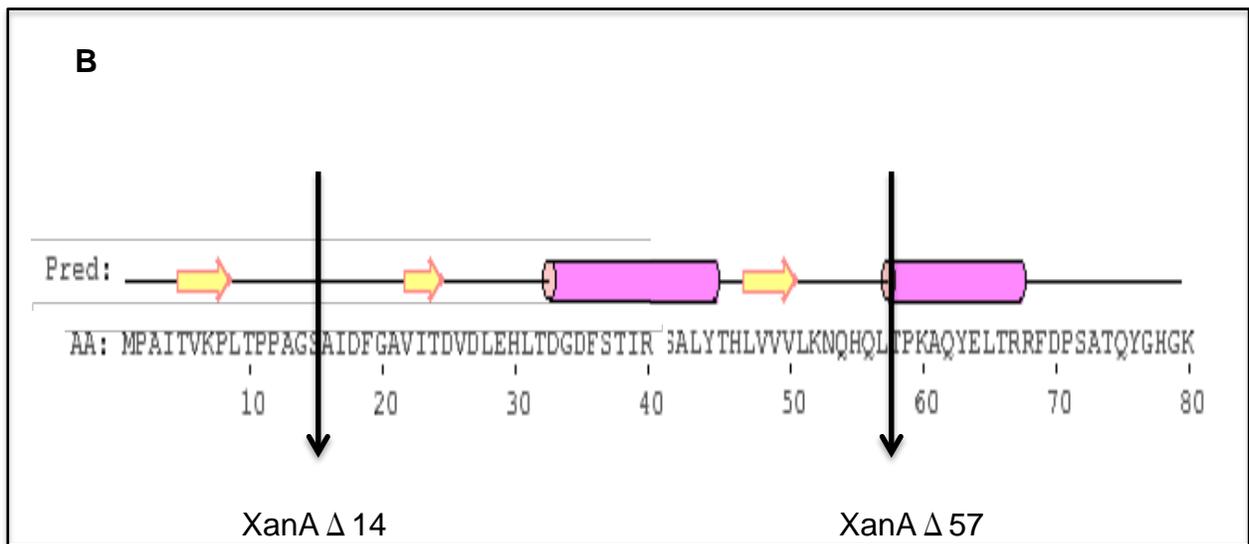
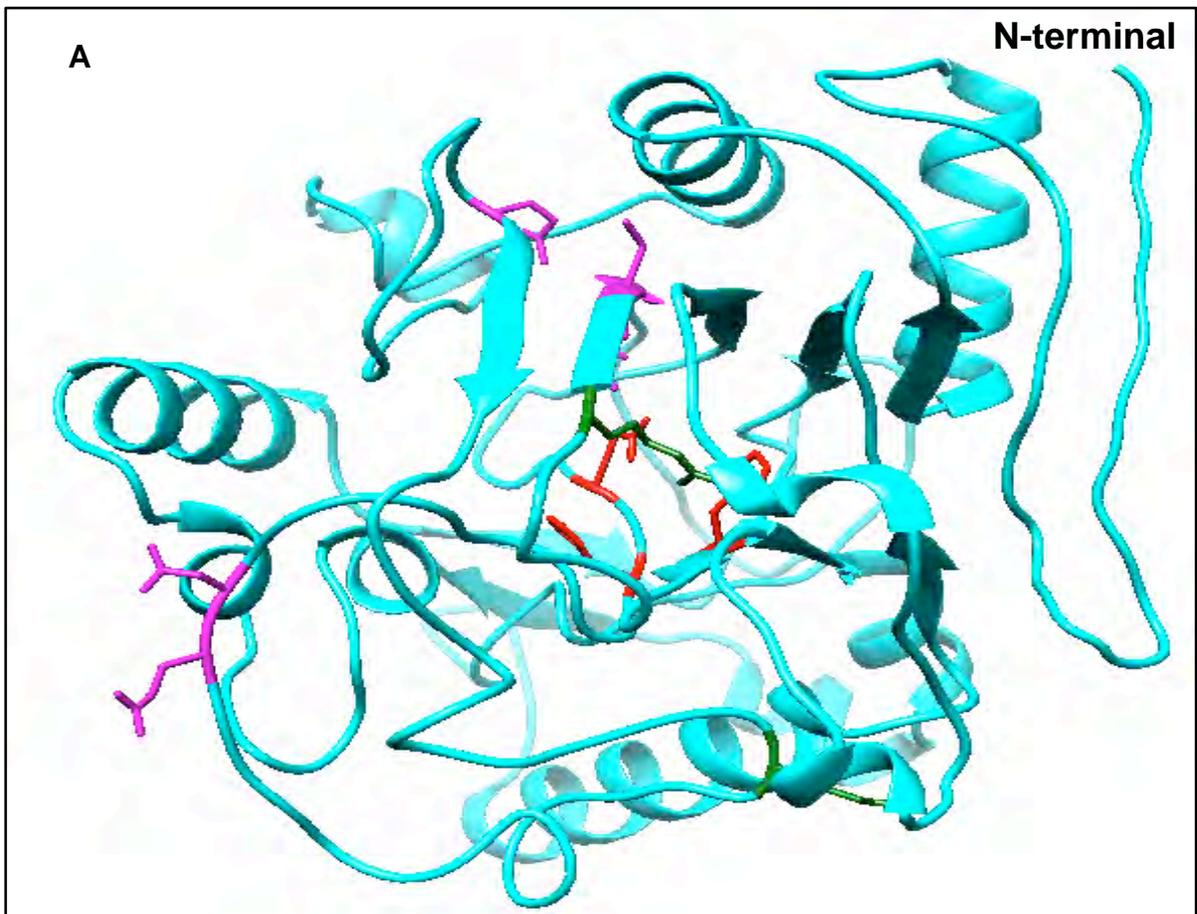
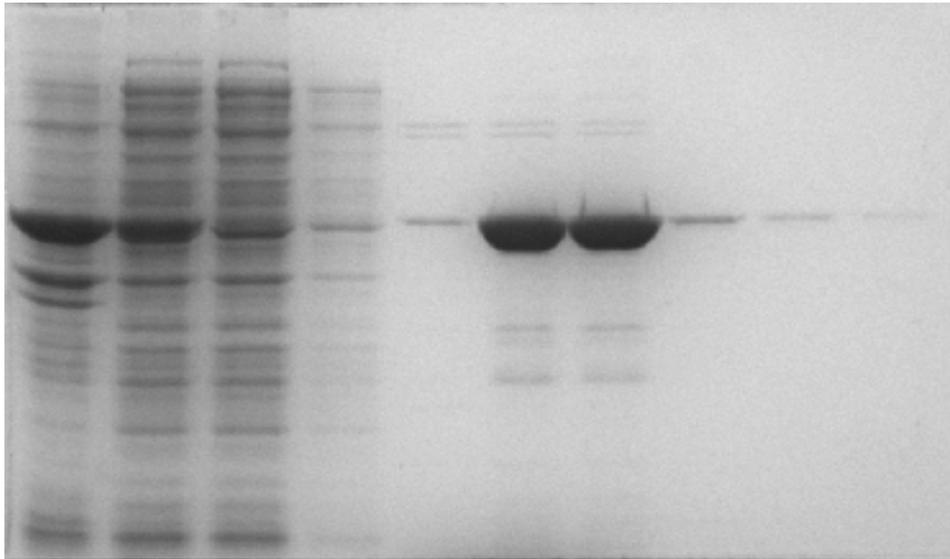


Figura 1. Modelo de la estructura tridimensional de XanA y predicción de la estructura secundaria.

Panel A. Esta ilustración muestra el modelo de la estructura tridimensional de la enzima XanA obtenido a partir de la plataforma I-TASSER. Los residuos que se encuentran de color rosa son D138, E137, Q101, C357 y N358, que participan en la unión de la xantina. Los residuos de color verde V352 y K122 participan en la unión del α -cetoglutarato y finalmente los residuos de color rojo D151, H149 y H340 participan en la unión de Fe^{+2} .

Panel B. Predicción de la estructura secundaria de 80 residuos aminoácidos del extremo N-terminal por el programa PSIPRED (Buchan *et al.*, 2013). En tubos de color rosa se observa las α hélice, las flechas de color amarillo indican las hojas β , la línea negra representa regiones sin estructura secundaria definida “coil”. Las flechas en negro indican el inicio de la construcción XanA Δ 14 y el inicio de la construcción XanA Δ 57.

A

F. Insol. F. Soluble Frente Lavado Marcador /----- Elución 250 mM imidazol-----/ 500 mM Imid.

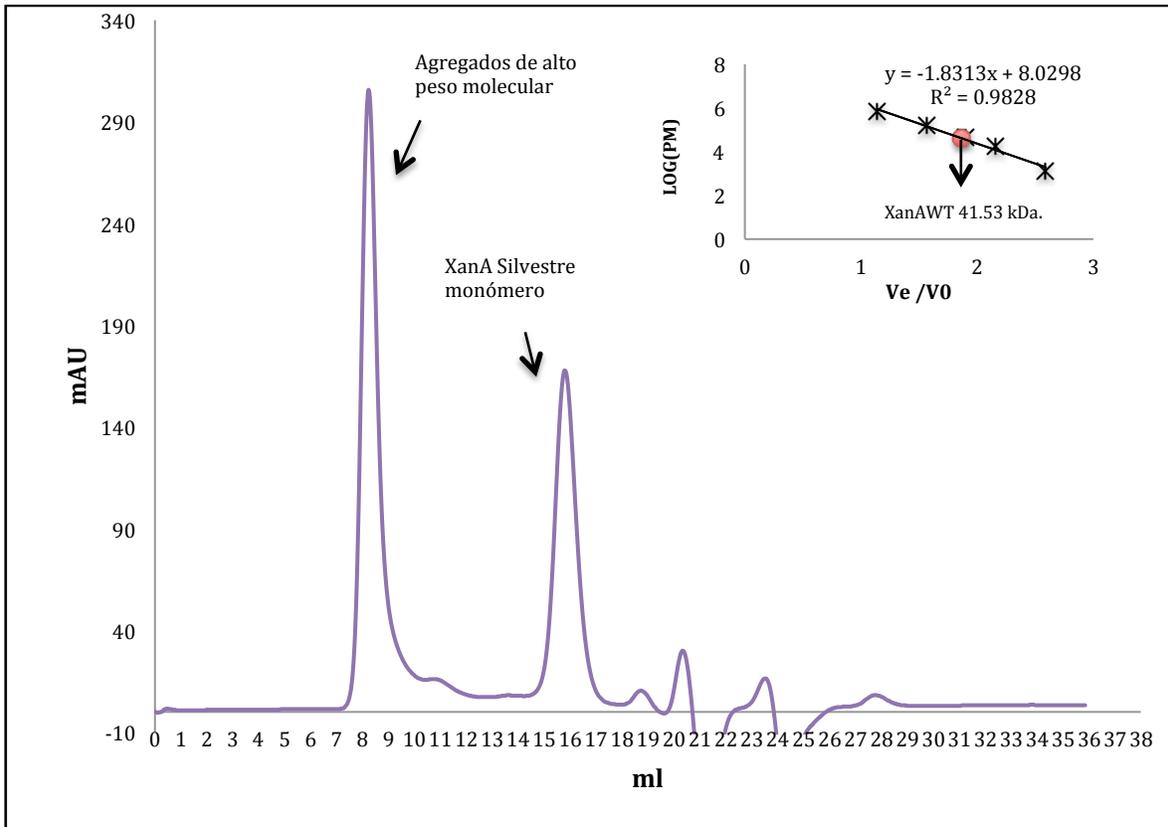
B

Figura 2. Purificación de la enzima XanA silvestre.

Panel A. Purificación de XanA silvestre por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado en presencia del detergente CHAPS y el sustrato Xantina. Las proteínas fueron resueltas en un gel SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie R-250.

Panel B. Cromatograma de XanA silvestre purificada inyectada en una columna Superdex 200 (10/300) mostrando su estado de oligomerización. Se presenta la absorbancia en función al volumen de elución. La corrida fue a un flujo 0.7 mL/min, el volumen de inyección fue 0.5 mL. El pico ubicado en los mL 15-17 pertenece a un monómero de la proteína XanA silvestre.

En la parte superior derecha se observa el análisis de regresión del V_e/V_0 de los estándares y de la proteína XanA silvestre. Las proteínas usadas como estándares son tiroglobulina (670 kDa), γ -globulina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) y Vitamina B₁₂ (1.3 kDa). Un análisis de regresión del V_e/V_0 (Volumen de exclusión/ Volumen muerto) del pico 15-17 en el perfil de XanA silvestre en la figura anterior muestra una masa de aproximadamente 41.53 kDa, indicando que uno de los estados conformacionales de XanA corresponde al monómero (círculo rojo).

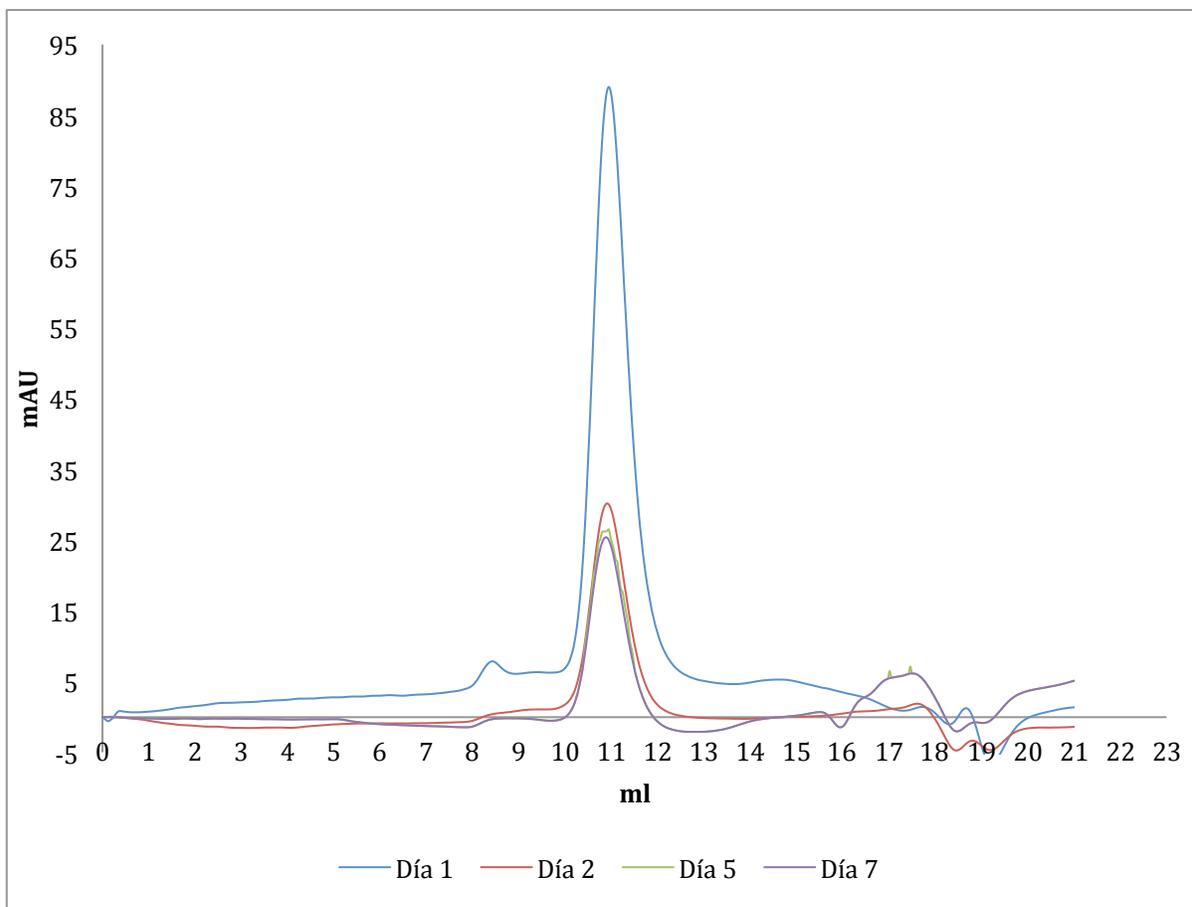


Figura 3. Cromatograma de la evaluación del estado de agregación de XanA silvestre en el tiempo.

En el cromatograma se observa una sola fracción predominante (11 ml) que corresponde a la forma monomérica de XanA. Los agregados de alto peso molecular que se observan en la figura 2B (fracciones 8 y 9), no se forman en el período y condiciones analizadas.

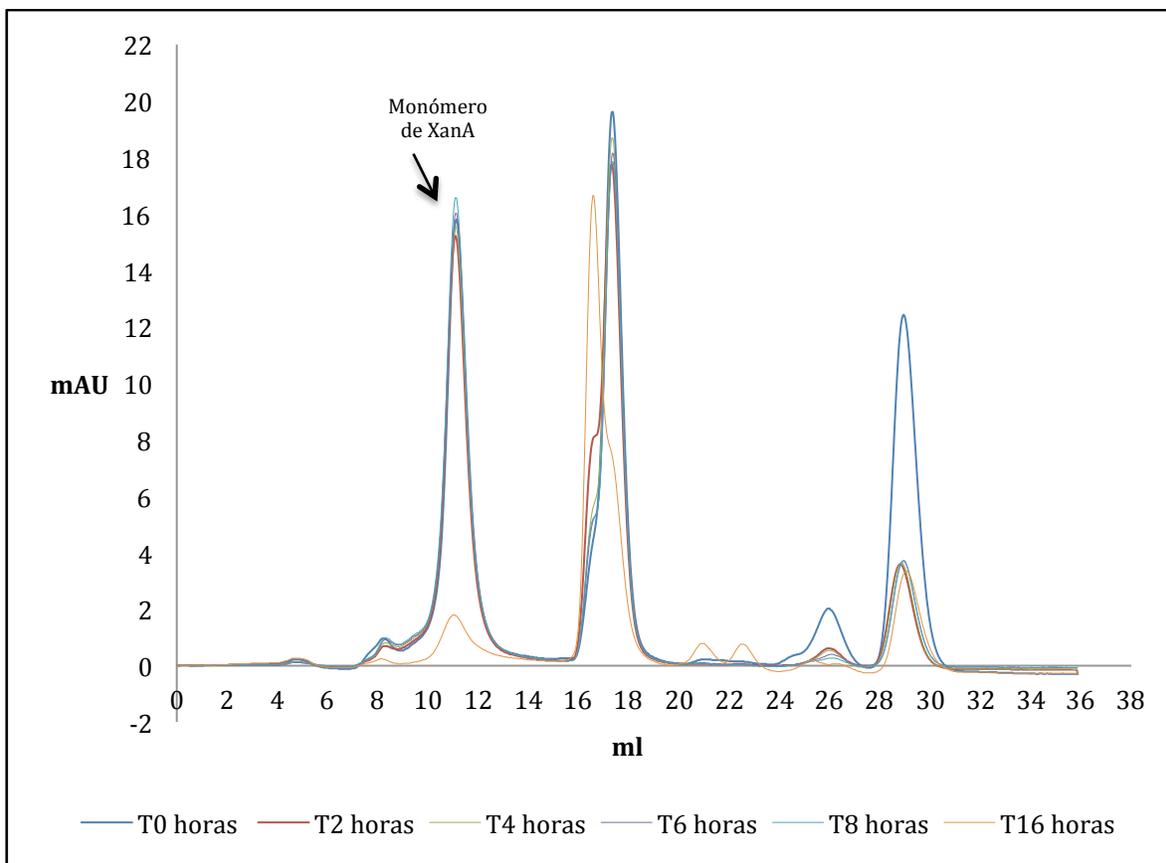
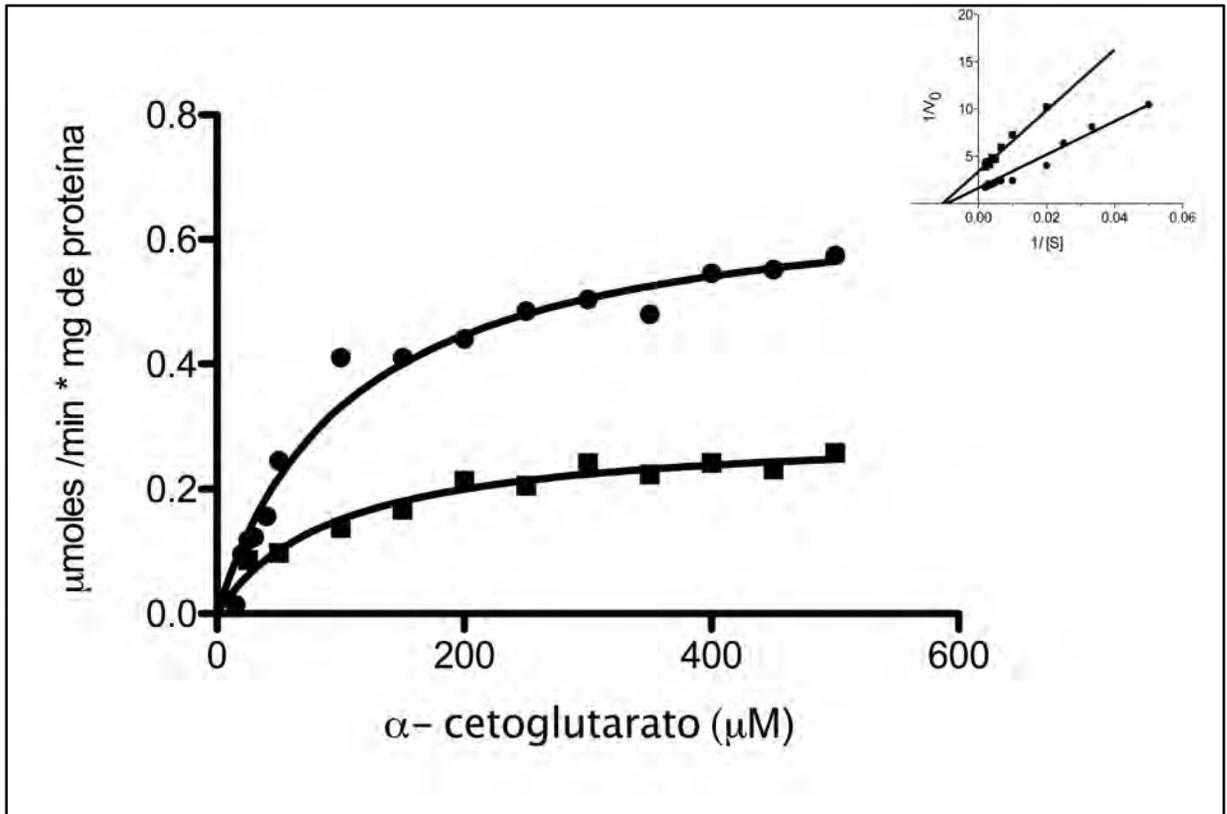


Figura 4. Seguimiento del estado monómero de la proteína XanA en MOPS.

Cromatograma de XanA silvestre en estado monómero inyectado por segunda ocasión en una columna Superdex 75 mostrando la permanencia del monómero con respecto al tiempo en donde T0: tiempo 0 horas, T2 : inyección a las 2 horas, T4 : inyección a las 4 horas, T6 : inyección a las 6 horas, T8 : inyección a las 8 horas, T16 : inyección a las 16 horas.

A



B

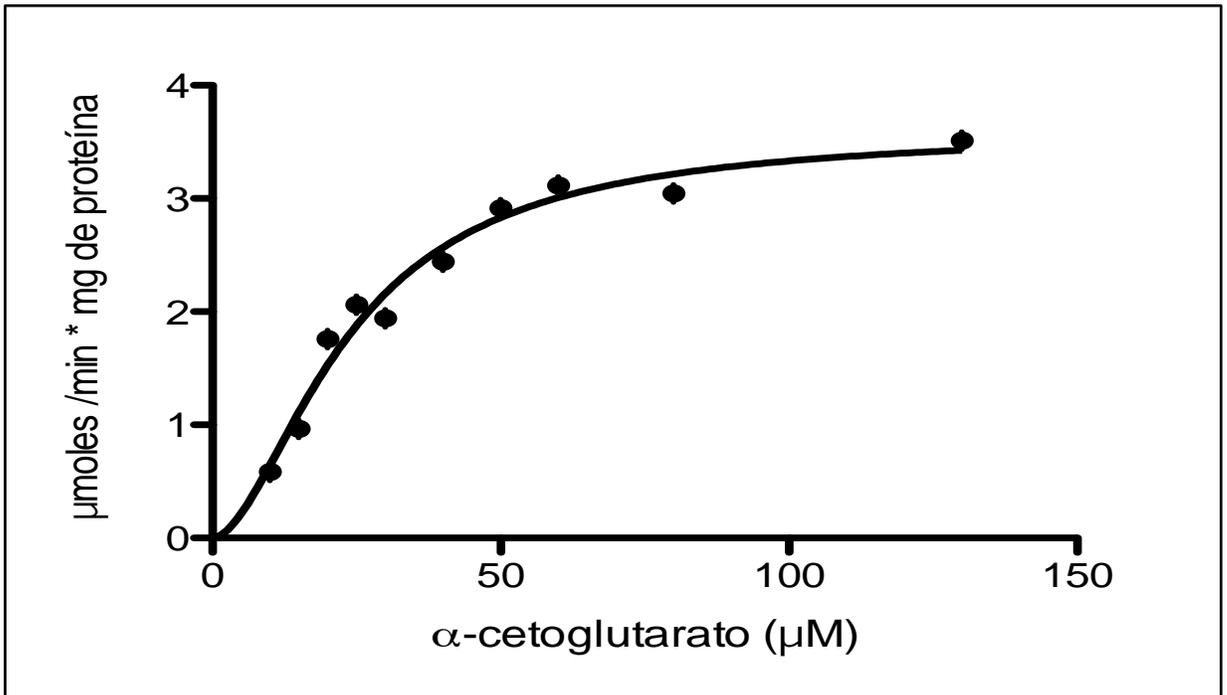
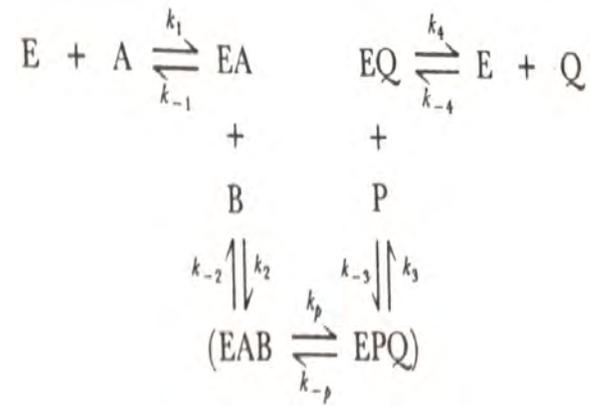


Figura 5. Cinética enzimática de XanA silvestre en estado monómero.

Panel A. En esta ilustración observamos una curva de la actividad enzimática de la proteína XanA silvestre en estado monómero, la cual se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten. (●) Reacción desencadenada con el sustrato α -cetoglutarato . (■) Reacción desencadenada con la enzima. En la parte superior derecha se muestra la representación gráfica de Lineweaver Burk, de los datos mostrados en el panel A.

Panel B. Cinética enzimática en equilibrio rápido de la proteína XanA silvestre purificada por afinidad a Ni^+ en un estado oligomérico no definido, variando la concentración de α -CG de 10-150 μM con los demás sustratos en condiciones saturantes , ajustada a la ecuación de Hill con $h=2$.



Esquema 1. Mecanismo enzimático Bi ordenado.

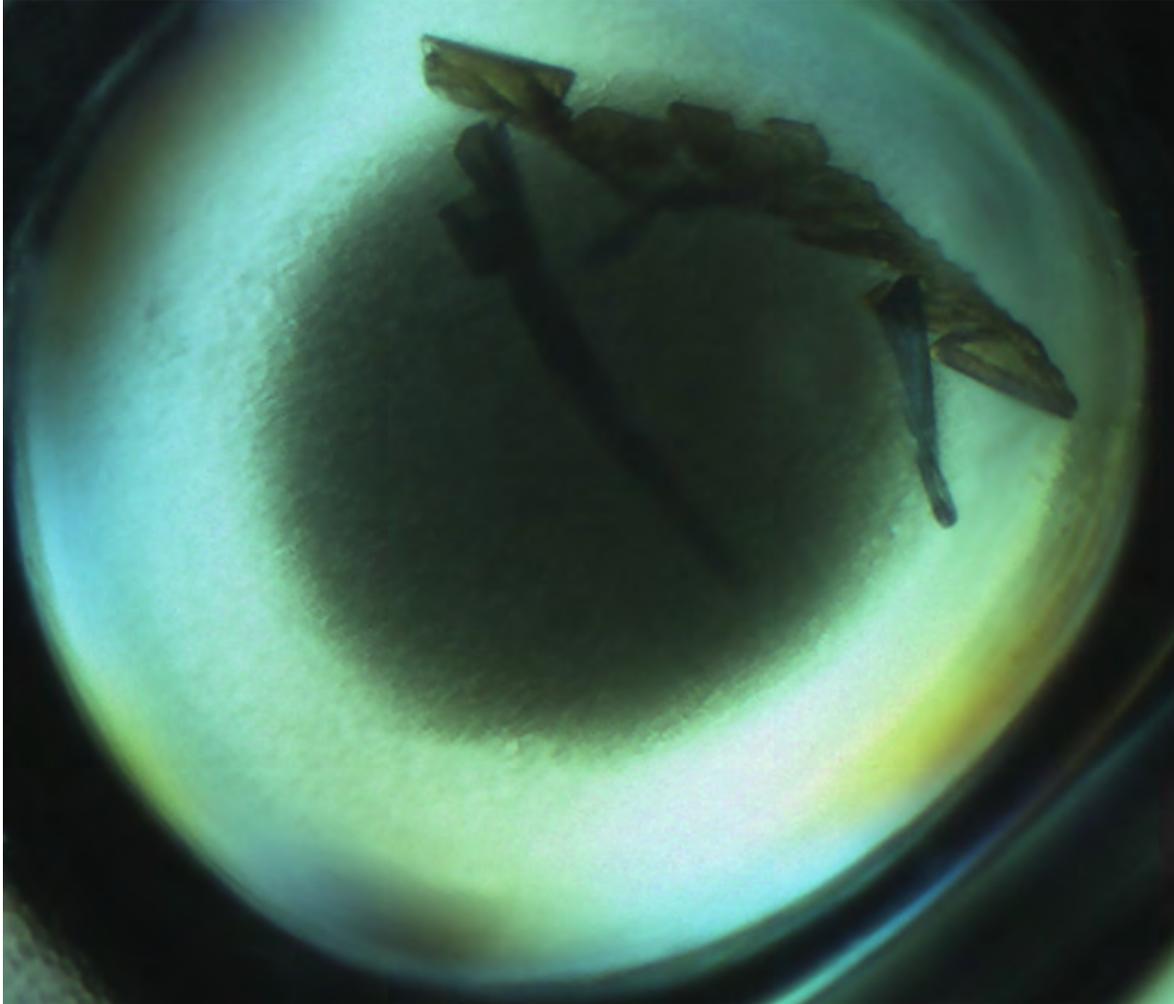


Figura 6 . Cristal de la proteína XanA.

Se observan varios cristales sin forma definida de la proteína XanA, obtenidos en la condición 39 del Crystal Screen 2 compuesto por 2% v/v Polyethylene glycol 400, 2.0 M Sulfato de Amonio y 10 mg/mL de XanA.

Material Suplementario

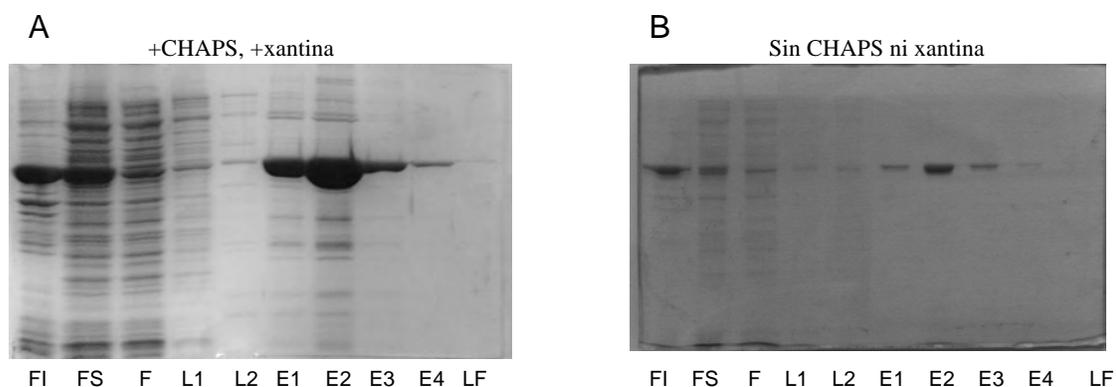


Figura suplementaria 1. Purificación de XanA, con y sin Xantina-CHAPS

En el panel A observamos la purificación de la proteína XanA por IMAC en la cual se uso CHAPS y xantina, FI: fracción insoluble, FS: fracción soluble, F: frente, L1: lavado 1, E1-E4: elución, LF: lavado final. En el panel B se presenta un gel SDS-PAGE de la purificación de XanA sin el uso de CHAPS ni xantina. (las abreviaturas son las mismas que en el gel del panel A). La única diferencia entre el panel A y B fue el uso de CHAPS y xantina.

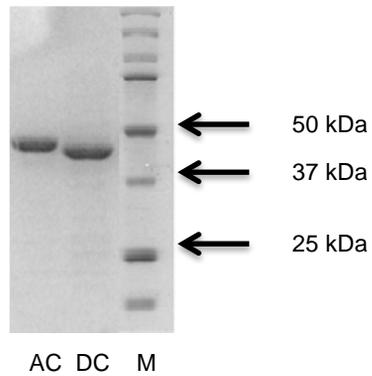


Figura suplementaria 2. Escisión de la etiqueta 6XHis.

Evaluación por SDS-PAGE de la escisión de la etiqueta 6XHis de la proteína XanA con la proteasa PPS. AC: antes del corte, DC: después del corte, M: marcador de peso molecular (Bio-Rad).