



ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y BIOINFORMÁTICO DE UNA ENZIMA DAHP SINTASA AISLADA DE UN BANCO METAGENÓMICO DE SUELO

Noé Arroyo, Arturo Montes de Oca, Francisco Bolívar, Adelfo Escalante. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos. 62210. noeaam06@gmail.com

Palabras clave: DAHPS metagenómica, *Candidatus Nitrospira defluvii*, *Escherichia coli*

Introducción. Una alternativa sustentable a la síntesis petroquímica de compuestos aromáticos (CA) es la biosíntesis microbiana a través de la vía común de síntesis de compuestos aromáticos (vía del shikimato), que transforman de fosfoenol piruvato (PEP) y eritrosa-4-fosfato (E4P) en corismato, principal intermediario de CA. La 3-deoxi-arabinoheptulose-7-fosfato (DAHPS) sintasa (DAHPS), es la primera enzima de vía y debido a que está controlada a nivel alostérico y transcripcional, ésta enzima ha sido blanco de diversas estrategias para la obtención de versiones insensibles a estos mecanismos de control con la finalidad de aumentar la producción de CA en cepas diversas cepas bacteriana. Debido a los casos exitosos del descubrimiento de nuevas enzimas con aplicaciones industriales provenientes de bancos metagenómicos (1), en el presente trabajo se secuenció y caracterizó por complementación funcional una DAHPS metagenómica y, se realizó un análisis estructural *in silico* con el propósito de conocer su posible estructura y propiedades bioquímicas.

Metodología.

Se subclonó un inserto metagenómico de ~3 kpb (3) con actividad DAHPS en el plásmido pJET1.2. La nueva construcción (pMS8) se secuenció por *primer walking* y la secuencia final se identificó por comparación de secuencia en la base de datos del GenBank. El gen codificante para actividad de DAHPS (DAHPSm) se amplificó por PCR a partir del plásmido pMS8 incluyendo el RBS del gen *aroG^{br}* de *Escherichia coli* DAHPS⁻ y se comparó la complementación funcional con una DAHPS resistente a control alostérico (*aroG^{br}*) asumiendo que la velocidad de crecimiento de las cepas transformadas es proporcional a la cantidad de aminoácidos aromáticos producidos por efecto de la DAHPSm y *AroG^{br}*. Por otra parte se obtuvo un modelo 3D de la DAHPSm en el programa I-TASSER para indagar sobre su el mecanismo de regulación a través de su estructura (3).

Resultados. El análisis de comparación de secuencias mostró que el gen que codifica a una DAHPSm tiene un 76% de identidad con el gen *aroF* de *Candidatus Nitrospira defluvii* (*aroFm*). LA complementación funcional de *aroFm* y *AroG^{br}* en una mutante de *E. coli* DAHPS⁻ mostró una velocidad específica de crecimiento en cultivos en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono de 0.251 h⁻¹ (*AroFm*) y 0.249 h⁻¹ (*AroG^{br}*). Suponiendo que durante la fase de crecimiento exponencial no hay

inhibición alostérica de estas enzimas y que el efecto sobre el crecimiento se debe a la velocidad de síntesis de aminoácidos aromáticos y se espera que sus propiedades catalíticas no sean diferentes. Esta hipótesis se corroboró con la obtención del modelo 3D de la *AroFm* (Fig.1) y posterior comparación con las estructuras de las DAHPS tipo Ia de *E. coli* *AroG*, *AroF* y *AroH* (Tabla 1). Los valores de RMDS indican que posiblemente *AroFm* es inhibida por Tyr.

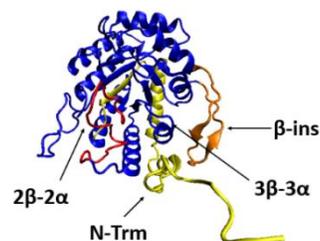


Fig. 1. Modelo 3D de *aroFm*. En azul el núcleo catalítico (α/β)₈, en naranja la inserción β implicada. En rojo el bucle 2 β -2 α . En amarillo el dominio N terminal (N-Trm).

Tabla 1. Alineamiento estructural las DAHPS codificadas por los genes *aroG*, *aroF* y *aroH* con el modelo de la DAHPSm. *AroF* y *AroH* son modelos obtenidos por I-TASSER.

Enzima	QH	RMDS
<i>AroH</i>	0.962	0.692
<i>AroF</i>	0.952	0.813
<i>AroG</i>	0.931	0.620

Conclusiones. Se clonó y secuenció una DAHPSm que complementa la actividad de DAHPS de manera similar a *AroG^{br}* de *E. coli*. El análisis *in silico* de la estructura de *AroFm* sugiere clasificarla como una DAHPS tipo Ia posiblemente inhibida por Tyr,

Agradecimiento. Para el desarrollo de este trabajo se contó con una beca para tesis de licenciatura del proyecto PAPIIT DGAPA-UNAM IN207914

Bibliografía.

1. Fernández-Arrojo, L., Guazzaroni, M.-E., López-Cortés, N., Beloqui, A., & Ferrer, M. (2010). *Curr Opin Biotechnol*, 21(6), 725–33.
2. Gutierrez Uriel (2013). Tesis de Maestría. IBT-UNAM.
3. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996). *J. Molec. Graphics*, 14.1, 33-38.