



00551  
10

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

GENERACION DE VARIANTES MONOMERICAS  
DE LA ENZIMA PENICILINO ACILASA DE  
*Escherichia coli.*

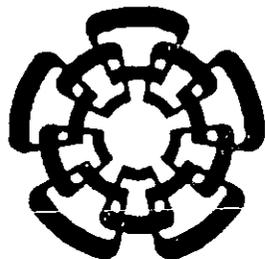
290541

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

GABRIELA FLORES RAMIREZ



MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE GENERAL

Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	3
Ingeniería de proteínas	3
Evolución dirigida	4
Generación de la diversidad genética	4
Identificación de variantes	4
Búsqueda diferencial	4
Selección	5
Permutación circular	6
Relación de la penicilino acilasa con los antibióticos $\beta$ -lactámicos	8
Mecanismo de obtención	9
Antibióticos $\beta$ -lactámicos semisintéticos	9
Penicilino acilasa	10
Superamilia de las Ntn-hidrolasas	12
Maduración de la penicilino acilasa	14
Características estructurales de la penicilino acilasa	14
Mecanismo de acción de la penicilino acilasa	17
Estrategias para optimizar la producción de penicilino acilasa	19
Objetivos	21
Diseño del sistema de selección de actividad de penicilino acilasa	22
Diseño de la permutación circular para obtener variantes de la penicilino acilasa monoméricas	23
Materiales y métodos	25
Medios y soluciones	25
Cepas	26
Secuenciación	26
Purificación de oligonucleótidos	26
Electrotransformación	26
Construcción de las cepas de selección para actividad de penicilino acilasa	27
Preparación del vector pACYC 184	28
Construcción de la $\beta$ -lactamasa bajo los promotores <i>trc</i> y silvestre en el plásmido pACYC 184	28
Selección de clonas de las cepas XL1-Blue y JM101 transformadas con la $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA	29
Construcción de la penicilino acilasa bajo promotor <i>trc</i> y <i>pblac</i>	29
Validación del intervalo dinámico de las cepas de selección de actividad de penicilino acilasa	30

Ensayos de concentración mínima inhibitoria	30
Ensayos en la cepa HB101PAC	30
Estrategias para la obtención de la biblioteca de genes permutados circularmente de la penicilino acilasa	31
Primera estrategia	31
Segunda estrategia	35
Tercera estrategia	37
Cuarta estrategia	39
Caracterización de las mutantes	41
Ensayos de MIC's	41
Adición de una etiqueta de 10 aa en algunas mutantes y enzima silvestre	41
Inmunodetección de las permutaciones circulares	43
Expresión de la proteína bajo promotor <i>pblac</i>	43
Actividades enzimáticas de extractos proteicos	43
Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford	43
Método de paradimetilaminobenzaldehido para la determinación de 6-APA	44
Clonación en el vector pET bajo promotor del fago T7	44
Inducción de la sobreexpresión de las enzimas mutantes	45
Expresión de la enzima silvestre	46
Purificación de las proteínas mutantes y silvestre en condiciones nativas	46
Obtención de los parámetros cinéticos de la penicilino acilasa silvestre y permutación circular	46
Titulación de sitios activos (PMSF)	46
Evolución dirigida por gene shuffling de la permutación circular L1	47
<b>Resultados</b>	49
Caracterización de la $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA	49
Construcción de las cepas de selección	50
Sistema de selección vs penicilino acilasa silvestre	51
Construcción de las variantes permutadas de la penicilino acilasa	52
Primera estrategia	53
Segunda estrategia	54
Tercera estrategia	55
Cuarta estrategia	56
Caracterización de las mutantes	58
Ensayos de expresión de la enzima monomérica vs silvestre	58
Expresión de las diferentes enzimas monoméricas de la penicilino acilasa	60
Inmunodetección de las enzimas monoméricas	61
Actividades de extractos totales de proteínas monoméricas	62
Purificación de enzimas con actividad de penicilino acilasa	64
Titulación de sitios activos de la penicilino acilasa	66
Caracterización cinética de las mutantes L1, L2 y la enzima silvestre	67
Evolución dirigida de la mutante L1	69

<b>Discusión</b>	70
Sistema de selección	68
Límite de resolución de las cepas de selección	72
Mutantes monoméricas	72
Análisis del conector	75
¿Existe un efecto de intoxicación en la bacteria por las proteínas monoméricas?	78
<b>Conclusiones</b>	82
<b>Perspectivas</b>	83
<b>Bibliografía</b>	84

Esta tesis se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, en el departamento de Bioestructura y Reconocimiento Molecular, laboratorio del Dr. Xavier Soberón Mainero bajo la asesoría del Dr. Joel Osuna Quintero.

LO que es conocido es finito, lo que es desconocido, infinito, intelectualmente, nos encontramos sobre un islote en medio de un océano ilimitado de materia inexplicable.

Thomas Henry Huxley

A todos los que de alguna manera han contribuido a derrumbar falsedades.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por contar con su apoyo incondicional, por sus enseñanzas, por ser un ejemplo de trabajo y por darme la vida.

A Pedro y Guillermo por ser mis hermanos.

A los nuevos amigos que encuentre: Paul Gaytán, María del Carmen Ramírez, Luis Ledezma, Deyanira Fuentes y Teresa Hernández, con quienes compartí momentos tristes, alegres y muchas pláticas a veces interminables..... Gracias.

A Rosalba Escamilla por su amistad aún en la distancia.

A los doctores Agustín López Munguía, Eduardo Horjales y Joel Osuna que fueron parte de mi comité tutorial por sus valiosos comentarios.

A mi comité revisor de tesis Dra. Gloria Soberón, Dr. Mario Soberón, Dr. Daniel Alejandro Fernández, Dr. Guillermo Gosset y Dr. Joel Osuna.

Al Dr. Joel Osuna por su asesoría y guía en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio con los que compartí un espacio-tiempo y en especial al Dr. Humberto Flores, por sus comentarios hacía esta tesis.

A Filiberto Sánchez por su apoyo técnico y buen humor.

A DGAPA por la beca otorgada.

A Maricela Olvera, René Hernández, Eugenio López y Paul Gaytán por sus apoyo técnico en las secuencias de DNA y síntesis de oligos.

A Juana Ferrer y Francisco Reyes por su apoyo con el material de laboratorio.

Y finalmente a mi México querido.

**Abreviaturas**

aa	aminoácido
6-APA	Ac. 6 amino penicilánico
Ala	alanina
Asn	asparagina
Cm	cloramfenicol
DNA	Ac. desoxirribonucleico
Gln	glutamina
hr (s)	horas
Kb	kilobases
$k_{cat}$	velocidad de recambio
$k_{cat} / K_m$	eficiencia catalítica
kD	kilodaltones
km	kanamicina
$K_m$	constante de Henri-Michaelis-Menten
KV	kilovoltios
LB	Medio Luria Bertani
min	minutos
MIC	ensayos de concentración mínima inhibitoria
Nt	nucleótidos
OD	densidad óptica
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDAB	método para determinar actividad (para-dimetilaminobenzaldehído)
P.G.	penicilina G
PM	peso molecular
PMSF	fenil metanosulfonil fluor
SDS	dodecil sulfato de sodio
Ser	serina
SSP's	penicilinas semisintéticas
SSC's	cefalosporinas semisintéticas
UV	radiación ultravioleta
Vmax	velocidad máxima
WT	silvestre

## RESUMEN

La penicilino acilasa es una enzima muy utilizada en la industria farmacéutica para la obtención de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Uno de los principales pasos que limita la producción de la enzima es el procesamiento post-traducciona dependiente de temperatura que necesita para ser activa. En este evento, un endopéptido es excindido de un propéptido inactivo para dar lugar a una proteína heterodimérica activa en el periplasma.

En este trabajo se planteó generar variantes de la penicilino acilasa que no dependieran del procesamiento post-traducciona para poder ser activas. Para lo cual, se construyó una permutación circular del gen de la penicilino acilasa, eliminando el endopéptido, obteniendo una enzima monomérica, donde los dos dominios importantes para la actividad fueron unidos por medio de un conector de cuatro aminoácidos (mutagenizados a saturación mediante técnicas de PCR), a fin de obtener una biblioteca donde se pudieran identificar a las mejores proteínas mutantes. Para seleccionar las mutantes activas fue necesario hacer una cepa de selección para actividad de penicilino acilasa en *E. coli*, con la característica de ser sensible a penicilina G y resistente a 6-APA. Para la identificación de las variantes se utilizó como sustrato de selección a la penicilina G, este sustrato al ser hidrolizado por la penicilino acilasa le confiere a la cepa resistencia a la penicilina G lo que le permite sobrevivir en medios adicionados con él. Se logró obtener varias mutantes con distintos conectores, aunque todas presentan problemas de expresión comparados con la enzima silvestre. Se midió la actividad de algunas mutantes y de la enzima silvestre a partir de extractos proteicos, donde se observó que las mutantes presentan menos del 50% de actividad respecto a la enzima silvestre. Debido a las diferencias de expresión, se semipurificaron las mutantes monoméricas L1 y L2 con secuencia en el conector NEGM y PGLR respectivamente, así como la enzima silvestre, las tres enzimas se caracterizaron cinéticamente a 37°C utilizando penicilina G como sustrato. La mutante L1 incrementó su eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) 2.698 veces con respecto a la enzima silvestre, mientras que la mutante L2 1.51 veces. En ambas enzimas éste incremento fue debido a una mejor afinidad por su sustrato. Como consecuencia de la monomerización la proteína puede producirse en *E. coli* a 37° C a diferencia de la enzima silvestre donde se produce entre 25 y 28 °C.

## INTRODUCCION

Gracias a las técnicas de DNA recombinante es posible que los genes de proteínas presentes en un organismo puedan ser clonados, expresados y secuenciados, así como el producto proteico purificado y caracterizado. El conocimiento bioquímico generado de estas proteínas, permite que puedan ser utilizadas en industrias biotecnológicas, farmacéuticas o agrícolas como biocatalizadores en procesos específicos, sustituyendo a procesos de bajo rendimiento y en algunos casos altamente contaminantes. Por otro lado han surgido metodologías para mejorar algunas de las características de las proteínas como son la ingeniería de proteínas y la evolución dirigida de proteínas. El principio básico de estas herramientas se basa en la modificación de la secuencia del gen para proveer o mejorar cierta función de la proteína codificada. Esto implica, que la proteína en su forma natural esta solo optimizada para su función dentro de la célula, pero es posible que acepte algunos cambios para mejorar su actividad.

### **Ingeniería de proteínas**

La ingeniería de proteínas integra la información sobre la estructura, secuencia, mecanismo de catálisis, función y propiedades bioquímicas, para diseñar y generar variantes de proteínas de forma racional, a modo de mejorar alguna de sus características en particular. Normalmente, en este tipo de estudio se diseñan cambios específicos que se introducen modificando el gen que codifica la proteína de interés, por medio de mutagénesis sitio dirigida utilizando PCR (reacción en cadena de la polimerasa) sobre uno o varios aminoácidos (Blundell et al, 1994). Las características que se han logrado mejorar por esta vía han sido estabilidad a un determinado pH o solvente (Chen et al, 1993 y del Río G. et al, 1995), termoestabilidad (Clarke J. et al, 1993; Scott N et al, 2000; Eder J. et al, 1992), incremento de la actividad (Graham et al, 1993) y en el caso de anticuerpos su "humanización" (Rees et al, 1994). En el diseño racional de proteínas existen varias limitaciones, como la escasa información estructural para la mayoría de proteínas y lo difícil de interpretar la información de la estructura en información de actividad biológica (Sleipe B. et al, 1999; Griffiths A. et al, 2000).

### **Evolución dirigida de proteínas**

Una alternativa al diseño de proteínas es la evolución dirigida, en donde el principio de la evolución Darwiniana, que involucra repetidos ciclos de mutación, recombinación y selección puede ser aplicado y acelerado en el laboratorio para generar enzimas mejoradas. Para la

evolución dirigida ya sea *in vivo* o *in vitro* es necesario tener tres componentes: primero, un método para generar la diversidad genética, segundo una vía para enlazar el genotipo al fenotipo y finalmente un método que permita identificar aquellas variantes con la actividad deseada. Para someter una proteína a un proceso de evolución *in vitro*, se generan los genes mutados por alguna metodología adecuada, éstos son clonados en un vector y transformados en una cepa hospedera, finalmente son sometidos a un proceso de identificación que puede ser selección o búsqueda diferencial de aquellas mutantes con la característica que se quiere modificar, este proceso se repite por varios ciclos para acumular mutaciones benéficas (Arnold F. et al, 1997).

### **Generación de la diversidad genética**

Se han generado varios métodos para este propósito, los cuales se basan en la mutagénesis al azar sobre el gen de interés y la búsqueda de aquellas variantes que muestran la característica deseable. Dentro de los métodos más exitosos se encuentran el PCR mutagénico o Error-prone-PCR (Craig C. et al, 1992), Gene Shuffling o PCR sexual (Stemmer WP, 1994-a; Stemmer WP, 1994-b y Zhao H. et al, 1997-a) y StEP o staggered extension process, el cual consiste en una recombinación *in vitro* de genes utilizando PCR (Zhao et al, 1998). Otro tipo de evento que permite generar variantes ha sido la permutación circular, la cual se menciona posteriormente (Goldenberg and Creighton, 1983).

### **Identificación de las variantes**

Uno de los problemas de generar un gran número de variantes, es la identificación entre toda la población de aquellas que tienen la característica requerida. Para identificar las posibles candidatas, se busca alguna característica fenotípica que pueda monitoriarse y relacionarse directamente al genotipo. Dentro de las técnicas más utilizadas se encuentran la búsqueda diferencial y la selección.

**a) Búsqueda diferencial (screening):** Con este método se pueden identificar las variantes con una característica específica de entre toda la población de mutantes generada. Estos estudios requieren ensayos individuales para cada miembro de la población. Por lo que analizar librerías de gran tamaño resulta laborioso, además de que necesitan métodos que desarrollen un color, un halo, turbidez, hidrólisis, etc., que permitan discernir de manera adecuada. Recientemente con la incorporación de robots de "high throughput screening " o "ultra-high-throughput" (Sundberg S, 2000) que engloban automatización, miniaturización y uso de métodos como

“phage display”, los ensayos dependientes de caja Petri van siendo excluidos cada vez más. La identificación de variantes por medio del robot requiere del desarrollo de ensayos altamente sensibles para la identificación de variantes que emitan señales detectadas por fluorescencia o que desarrollen reacciones que puedan ser medidas en el espectrofotómetro. La principal limitante de este sistema son los grandes costos que implica comprar y mantener este equipo, lo que lo hace inaccesible por el momento.

**b) Selección:** Es el enriquecimiento de variantes activas en una librería molecular. La selección puede ser de tres tipos, completamente *in vivo*, *in vitro*–*in vivo* y totalmente *in vitro*.

En sistemas *in vivo*, la selección requiere que la actividad a identificar pueda representar una ventaja de crecimiento a la cepa hospedera en una condición determinada. La selección se realiza en un compartimento de la célula y puede involucrar el complemento de una función que la cepa inicialmente no tiene, proveer una sustancia esencial para crecer o la neutralización de un compuesto que le es tóxico o que inhibe su crecimiento.

Una de las técnicas más utilizadas es la complementación de la actividad, donde se utiliza una bacteria que es deficiente en la actividad o función que se busca, de esta manera se puede seleccionar a aquellas bacterias que adquieran la propiedad buscada por tener el gen que complementa la actividad o función. Dentro de los ejemplos de sistemas de selección se encuentran aquellos en donde se involucran a enzimas que catalizan vías metabólicas críticas (Riaño, L. 2000 y Juárez R., 2000), que confieren resistencia a algún sustrato como antibióticos, contaminantes, pesticidas, hidrocarburos etc., o que liberan algún nutriente esencial para el crecimiento de la cepa hospedera. La selección presenta la ventaja de ser un método rápido y económico ya que permite analizar una mayor población de variantes y al mismo tiempo evaluar directamente la actividad de la enzima por la capacidad que le confiere a la cepa hospedera de crecer en las condiciones de selección.

Tanto la búsqueda diferencial como la selección *in vivo*, presentan limitantes debido a que la célula por sí misma puede seleccionar o discernir en cuanto al mantenimiento de las variantes dentro de ella. La generación de algunas enzimas o de algún producto, puede representar una desventaja que le afecte para el mantenimiento de la homeostasis y de esta forma se puede contra seleccionar la variante deseada. Otro problema común en la selección son las mutaciones espontáneas en la célula huésped, que pueden dar falsos positivos en las condiciones de selección.

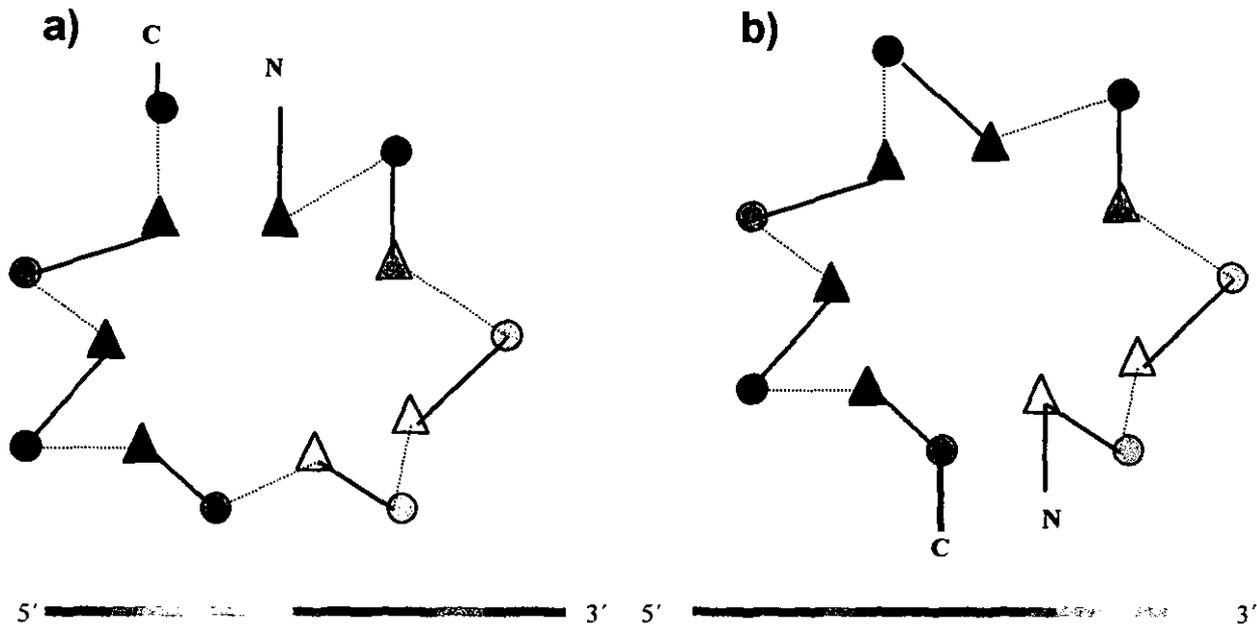
Debido a las limitaciones que presentan tanto la ingeniería de proteínas como la evolución dirigida, se han utilizado los recursos disponibles de ambas para tratar de evolucionar proteínas *in vitro* involucrando el diseño racional. De la ingeniería de proteínas se ha tomado el análisis de estructuras y de bases de datos así como el uso de algoritmos computacionales para identificar algún tipo de estructura o motivos estructurales (alfa hélices, estructuras de hojas beta plegada, vueltas beta, etc.), con los cuales se puede obtener información de homología entre secuencia y estructura, energía mínima de la conformación, análisis de la topología, exposición al solvente etc., que pudieran ayudar a discernir entre los cambios adecuados (Voigt Ch. et al, 2000; Zhang Ch. et al, 2000, y Chotia C. et al, 1997). De la evolución dirigida se han tomado las técnicas para generar la variabilidad y de selección. De esta combinación, el caso más exitoso ha sido la migración catalítica de actividad de PRAI (fosforibosil antranilato isomerasa) a IGPS (indol glicerol fosfato sintasa). En este caso se escogieron como modelos, dos actividades consecutivas en la biosíntesis de triptófano, en donde el producto de PRAI es el sustrato de IGPS. Ambas enzimas están formadas por un dominio de barril  $\alpha/\beta$  y sus sitios activos difieren considerablemente. En este trabajo, la estrategia general consistió en la modificación del gen que codifica para IGPS, primero se deletaron elementos de estructura secundaria no observados en PRAI (una alfa hélice en el amino terminal y un loop), posteriormente se introdujo un Asp que es un residuo consenso en PRAI de diferentes organismos que no está presente en IGPS y finalmente se realizaron ciclos de gene shuffling y selección *in vivo* hasta lograr identificar una IGPS que isomerizara el sustrato de PRAI (N-5' fosforibosil antranilato) (Altamirano M. et al, 2000).

### **Permutación circular**

El estudio de proteínas genéticamente alteradas ha comenzado a ser una estrategia importante para examinar la relación entre la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de las proteínas. En la mayoría de los casos el efecto de la sustitución de uno o varios aminoácidos en la estructura, estabilidad o plegamiento ha sido estudiado a detalle. Recientemente se ha estudiado el efecto que puede causar el intercambio de los elementos de estructura secundaria en la estabilidad, plegamiento y actividad de una proteína. Para ello se ha realizado un evento conocido como permutación circular.

Una permutación circular es el resultado de la unión del carboxilo terminal y el amino terminal de la proteína y la generación de nuevos sitios amino y carboxilo terminal en alguna otra parte de la proteína (figura 1). Este tipo de evento se ha realizado por ingeniería genética en la mayoría de los casos, en la naturaleza también han ocurrido permutaciones circulares las

cuales han sido identificadas por comparaciones de la estructura primaria y secundaria en varias familias de proteínas (Lindqvist Y et al, 1997).



**Figura 1.** Diagrama topológico de un barril  $\alpha/\beta$  en donde se muestra el evento conocido como permutación circular, en la parte inferior se muestra este evento a nivel de gen. Los extremos amino y carboxilo terminales originales se unen y se generan otros en un sitio diferente. a) enzima silvestre y b) enzima permutada circularmente. Los triángulos simbolizan betas plegadas y los círculos alfa-hélices.

Dentro de las proteínas permutadas circularmente en la naturaleza se encuentran la concanavalina A presente en plantas, la cual del resultado de modificaciones post-traduccionales, se genera una proteína muy similar a la lectina tridimensionalmente, pero con diferencias en la conexión de los elementos de estructura secundaria y en los sitios amino y carboxilo terminal (Cunningham et al, 1979).

La eswaposina otra proteína de plantas, surgió por una permutación circular a nivel de gen de una saposina (Ponting et al, 1995). Las glucosiltransferasas son otro ejemplo de una permutación circular a nivel de gen. Esta enzima presenta un dominio de barril  $\alpha/\beta$  permutado circularmente respecto a las  $\alpha$ -amilasas (figura 1). El barril  $\alpha/\beta$  de la glucosiltransferasa comienza en una alfa-hélice que corresponde a la hélice tres en la  $\alpha$ -amilasa (MacGregor et al, 1996). La transaldolasa, es un ejemplo de como se puede generar una actividad de novo por una permutación circular, está enzima al igual que la aldolasa clase I presenta una estructura de barril  $\alpha/\beta$ . Como en el ejemplo anterior, las posiciones de los sitios amino y carboxilo terminal

son diferentes, pero en la estructura tridimensional presentan una alta homología (Lindqvist Y et al, 1997).

### **Permutaciones circulares construidas por ingeniería genética**

Las características requeridas para permutar circularmente un gen son: que los extremos amino y carboxilo en la estructura estén cercanos entre sí, estén favorablemente orientados y con la generación de los nuevos sitios amino y carboxilo terminales no se afecte drásticamente la estructura tridimensional. Las proteínas permutadas circularmente han servido en estudios tan diversos como evolución, plegamiento, estabilidad y actividad.

La primera permutación circular se realizó en 1983 con el inhibidor de la tripsina pancreática (BPTI), la unión entre el amino y carboxilo terminal fue mediante síntesis química y la generación de los nuevos sitios se realizó con una proteasa específica (Goldenberg et al, 1983).

Luger en 1989 abrió un nuevo camino al incorporar la ingeniería genética para crear la permutación circular de la fosforibosil antranilato isomerasa (PRAI) (Luger K et al, 1989).

Otras proteínas que se han modificado genéticamente para obtener permutaciones circulares han sido la  $\alpha$ -espectrina (Viguera A. R. et al, 1995), aspartato transcarbamoilasa (Graf R. et al, 1996),  $\alpha$ -amilasa (MacGregor E. A., et al, 1996),  $\beta$ -lactamasa (Pieper U. et al, 1997), dihidrofolato reductasa (Iwakura, M. et al, 1998),  $\beta$ -glucosidasa de *Bacillus* (García-Valvé S et al, 1998), Eco AI (Janscak P et al, 1998), 1,4  $\beta$ -glucanasa (Aÿ J. et al, 1998), cristalina  $\beta$ B2 del lente del ojo (Wieligmann K. et al, 1998), la proteína verde fluorescente (Baird G. et al, 1999) y disulfuro oxido reductasa DsbA (Hennecke J. et al, 1999).

### **Relación de la penicilino acilasa con los antibióticos $\beta$ -lactámicos**

El éxito de la penicilina y sus derivados se debe a que tienen una alta eficiencia y especificidad cuando son utilizados como agentes antibacterianos (Frère & Nguyen-Distèche, 1992) y solo en 1998 de los 252,698 millones de dólares correspondientes a las ventas totales mundiales de medicamentos, 6,878 millones corresponden a antibióticos de tipo cefalosporánico y 3,818 millones corresponden a penicilinas (Pharmaceutical and Healthcare Industries, 1998).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) forman una gran familia que tienen en común un anillo  $\beta$ -lactámico. Al inhibir las enzimas transpeptidasas, ambos antibióticos interfieren en la biosíntesis del péptidoglicano, el mayor constituyente de la pared celular bacteriana (Frère et al. & Ghuysenand et al, 1991), el péptidoglicano es un heteropolímero compuesto de N-acetilglucosamina y Ac. N-acetilmurámico alternados y unidos por enlaces  $\beta$  (1-4), que forman una red tridimensional la cual encierra completamente a la bacteria

manteniendo la forma y rigidez de la pared celular para protegerla de presiones osmóticas. Debido al uso indiscriminado de estos antibióticos durante las últimas décadas, se han seleccionado cepas resistentes a ellos, de ahí la necesidad de crear nuevos antibióticos que los sustituyan (Travis J., 1994). El mecanismo más común de resistencia bacteriana a estos antibióticos es la inactivación por la ruptura del enlace amídico del anillo  $\beta$ -lactámico mediante las enzimas  $\beta$ -lactamasas (Foye W. O., 1988).

### **Mecanismo de obtención**

La preparación comercial de la penicilina se basa en la técnica de cultivo sumergido, utilizando la cepa *Penicillium chrysogenum*. La fermentación dura alrededor de 4 a 5 días, con control de la aireación y con adición de antiespumantes, periódicamente se le adiciona ácido fenilacético para conseguir la síntesis de penicilina G o ácido fenoxiacético para producir penicilina V. Debido a que la efectividad de la penicilina G se ha visto disminuida por la aparición de cepas resistentes, han surgido los antibióticos  $\beta$ -lactámicos de tipo semisintético (Glazer A.N. et al, 1994).

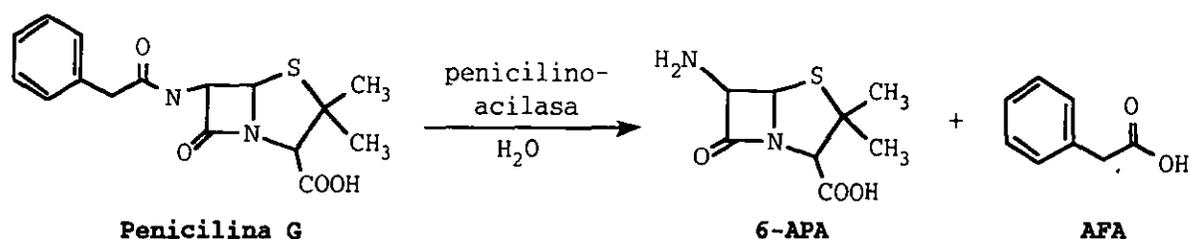
### **Antibióticos $\beta$ -lactámicos semisintéticos**

Este grupo se puede dividir en dos tipos; las cefalosporinas que tienen un anillo  $\beta$ -lactámico fusionado a un anillo de seis miembros llamado 1,3 tiazina y las penicilinas, cuyo anillo  $\beta$ -lactámico está fusionado a un anillo de cinco miembros llamado tiazolidino (figura 3).

En la producción industrial de antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos la conversión química tradicional de penicilina G a 6-APA, ha sido reemplazada por procesos catalizados por enzimas.

Algunas compañías han reemplazado la hidrólisis química que requiere de compuestos químicos y solventes costosos altamente contaminantes, por la penicilino acilasa que cataliza la hidrólisis en un ambiente acuoso. A pesar que se conoce desde hace cinco décadas que la penicilino acilasa convierte la penicilina G en 6-APA (figura 2) sólo en la última década ha sido introducida con éxito en los procesos industriales. Una de las principales causas han sido los problemas para producirla en forma activa.

El 6-APA es un intermediario que se utiliza en la preparación de las penicilinas semisintéticas y de ahí el interés en mejorar su producción.



**Figura 2.** Reacción de la enzima penicilino acilasa sobre la penicilina G.

La obtención de antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos se lleva a cabo mediante hidrólisis de penicilina G (figura 3:E1) o cefalosporina G por la penicilino acilasa, con el fin de obtener ac. 6-aminopenicilánico (6-APA) y ac. 7aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA). Posteriormente, el 6-APA y 7-ADCA son transformados en penicilinas semisintéticas (SSP's) y cefalosporinas semisintéticas (SSC's), mediante la condensación con D-(-) fenilglicina o derivados de D-(-) 4-hidroxifenilglicina por síntesis química, respectivamente (Figura 3:Q3, Q4). Recientemente se ha intentado sustituir estos últimos pasos por una etapa de condensación asistida por la propia penicilino acilasa en procesos de producción de antibióticos de gran valor comercial como son amoxicilina, ampicilina, cefaclor, cefadril y cafalexin (figura 3:E3, E4) (Bruggink A. et al, 1998). Por otro lado, para obtener la cefalosporina G se necesita la expansión de su anillo tiazolidino a un anillo de tipo 1,3 tiazina (figura 3:Q1, E5) que puede ser transformado por síntesis química o por la enzima expandasa (Walsh Ch. et al, 2001). Por un mecanismo similar y dos pasos extras de síntesis química, la penicilina G se puede transformar en cefalosporina C, otro intermediario en la fabricación de antibióticos cefalosporánicos, (figura 3:Q1, E5). A partir de la hidrólisis química de la cefalosporina C se puede obtener 7-ACA, que es un intermediario muy parecido al 7-ADCA que se utiliza también como precursor para antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos.

### Penicilino acilasa

La enzima penicilino acilasa (PA, EC 3.5.1.1.1) es conocida también como penicilino amidasa, dependiendo del sustrato que hidroliza esta familia se clasifica de la siguiente forma:

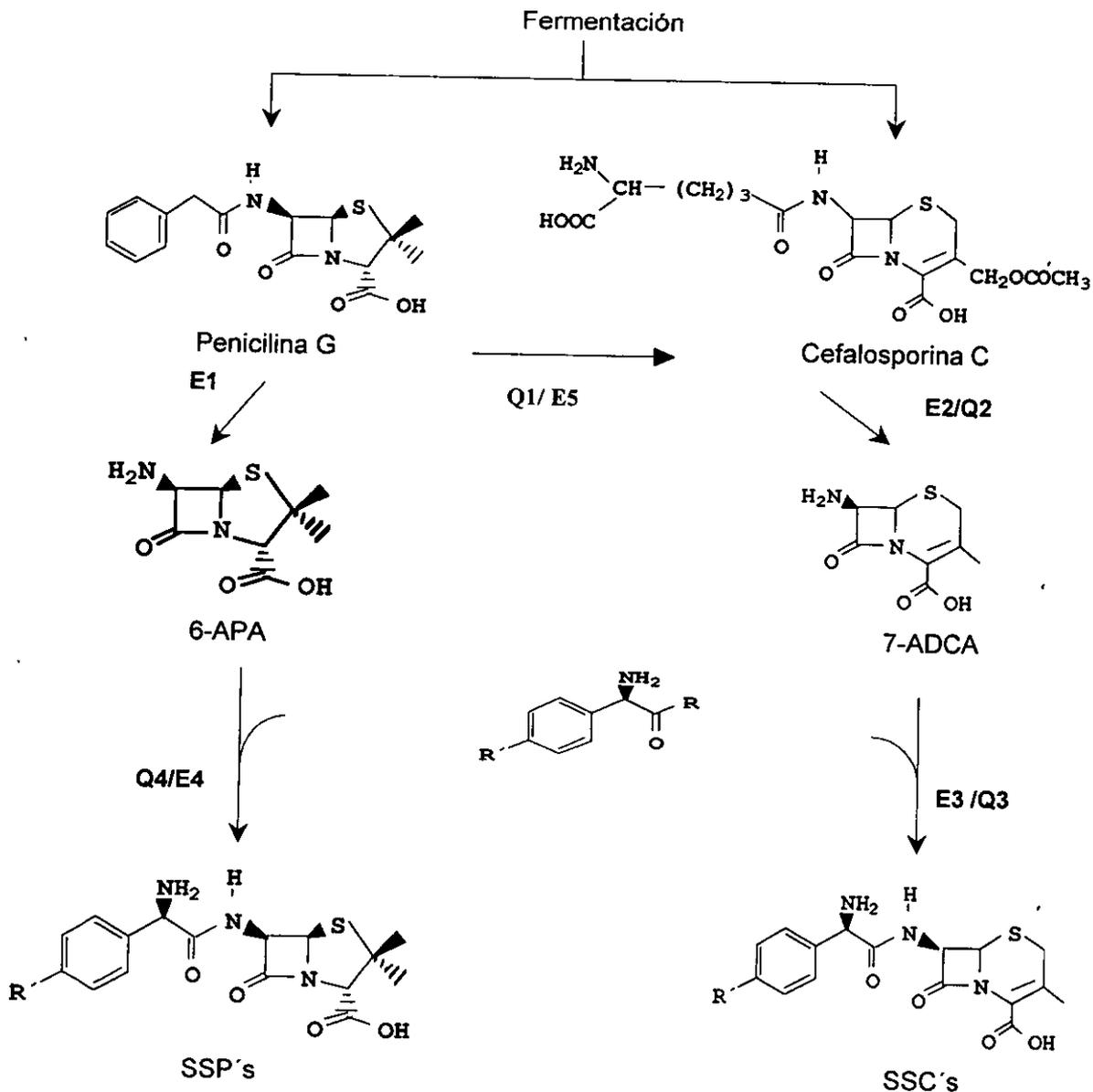
Tipo I: hidrolizan preferencialmente la penicilina V (fenoximetilpenicilina).

Tipo II: especificidad por Penicilina G (bencilpenicilina).

Tipo III. específicamente la ampicilina (D-A-aminobencilpenicilina) (Vandamme, 1989).

La actividad de penicilino acilasa está presente en una gran variedad de organismos, como Gram (-), Gram (+), hongos filamentosos y levadura. El número de microorganismos que han demostrado poseer actividad de penicilino acilasa es amplio, dentro de los organismos donde

se ha identificado la enzima tipo II se encuentran: *Escherichia coli*, *Proteus rettgeri*, *Bacillus megaterium*, *Penicillium notarium* y para penicilina V: *Fusarium oxisporium*, *Kluyvera citrophila*, *Alcaligenis faecalis*, *Kluyvera citrophila*, *Pseudomonas melanogenum*, *Streptomyces lavendulae*, *Micrococcus roseus* (Savidge T.A. and Cole M, 1975). La función de la penicilino acilasa no está muy clara, pero se ha sugerido que en la cepa *E. coli* ATCC 11105 de donde fue aislada, pueda estar involucrada en la degradación de compuestos fenilacetilados, generando ac. fenilacético, el cual puede ser utilizado como fuente de carbono (Valle F. et al, 1991).



**Figura 3.** Obtención de antibióticos beta-lactámicos semisintéticos.  
 Q: paso asistido por síntesis química. E: paso catalizado por una enzima.

La penicilino acilasa de *E. coli* ( tipo II ) ha sido la enzima más utilizada a nivel industrial en el proceso de producción de 6-APA a partir de la penicilina G. Por otro lado, *E. coli* ha facilitado esto, debido a que es un microorganismo conocido desde un punto de vista genético y metabólico, lo que facilita su manipulación para incrementar el rendimiento de la penicilino acilasa y por la ventaja que representa el poder producirla en grandes lotes y cortos tiempos, dada su alta velocidad de crecimiento. Se ha encontrado que la penicilino acilasa tiene especificidad por sustratos con grupos fenilo presentes en penicilina G, 7-PADCA, ampicilina, etilfenilacetato, p-nitrofenil, fenilacetato, p-nitroanilina, fenilacetilglicina, ac. bencilpenicilánico, cefalotin, cefaloridina, ampicilina, cefalexina, cefalosporina G (Margolin A., et al, 1980). También se le ha conferido especificidad mediante mutagénesis química hacia glutaril-L-leucina (Forney L.J. et al, 1989-a), bromohexamida (Daumy G.O. et al, 1985) y D-(-)- $\alpha$ -aminofenilacético-(L)-leucina (Forney L.J. et al, 1989-b).

La penicilino acilasa ha sido involucrada en reacciones de estereoselectividad, como nucleófilo en la resolución de aminoácidos y esteres péptidicos (Furganti et al, 1986), así como en la protección y desprotección de grupos hidroxilo y amino de azúcares y péptidos (Bossi A. et al, 1998) y en años recientes se le ha involucrado como activador de profármacos específicos por su actividad de acilasa (Lu JY et al, 1999).

### **Superfamilia de las Nucleofil amino terminal-hidrolasas ( Ntn-hidrolasas)**

Esta superfamilia estructural fue propuesta en 1995 por Brannigan y hasta el momento en la base de datos SCOP se han clasificado seis proteínas (Murzin AG et al, 1995). Todas estas proteínas son amidohidrolasas porque hidrolizan grupos amidas en diferentes sustratos. Dentro de ella se pueden encontrar la glutamina PRPP amidotransferasa (GAT), subunidad  $\beta$  del proteasoma (Lowe J. et al, 1995), penicilino acilasa G, glucosilasparaginasa (AGA) (Kaartinen V et al, 1991),  $\gamma$ -glutamilttransferasa (GGT) (Suzuki H, et al, 1989) y penicilina acilasa V (Suresh C.G. et al, 1999). Algunos datos cristalográficos (Kinoshina, T. et al, 2000; Kim Y. et al, 2000) y de procesamiento post-traducciona (Li Y et al, 1999) sugieren que la cefalosporina acilasa puede pertenecer a esta superfamilia, de igual manera sucede con la glutaril acido 7-aminocefalosporanico acilasa (GL-7ACA) (Lee Y S et al, 1998; Lee Y S et al, 2000 y Know T et al, 2000). Por su parte, la enzima (HslV) de *E. coli* presenta identidad estructural y similitudes en la maduración post-traducciona con la subunidad  $\beta$  del proteasoma por lo que es otra candidata a pertenecer a esta superfamilia (Bochtler M et al, 1997). Dentro de las características de esta superfamilia es que todas son generadas a partir de un precursor

inactivo que sufre un proceso post-traducciona, en donde se excinde un endopéptido a partir del propéptido inactivo, generando un nuevo extremo amino, en el cual se encuentra un residuo nucleofílico que participa directamente en la autoproteólisis y catálisis (Brannigan J. A., et al, 1995), este residuo nucleofílico puede ser Thr, Ser o Cys (tabla 1).

Esta familia no presenta una alta homología a nivel de estructura primaria ni terciaria, pero posee un plegamiento relacionado el cual puede ser superpuesto tridimensionalmente, caracterizado por un núcleo de siete hojas beta antiparalelas (sandwich) que son espacialmente equivalentes flanqueadas en ambos extremos por dos  $\alpha$ -hélices ( $\alpha\beta\beta\alpha$ ).

Hasta el momento, no está claro si esta superfamilia es el resultado de evolución divergente a partir de una proteína ancestral o si es el resultado de evolución convergente en la cual proteínas no relacionadas tienen forma independiente de llegar a una estructura similar (Artymiuk, P. et al, 1995).

**Tabla 1. Secuencias en el N-terminal de miembros de la superfamilia Ntn-hidrolasa.**

nucleófilo	hidrolasa	Secuencia N-terminal	fuelle	referencia
Ser	PGA	<b>SNMWVIG..</b>	<i>E. coli</i>	Duggleby H,1995
	CAI	<b>SNSWAVA..</b>	<i>Pseudomonas</i>	Matsuda,1985 Ishii ,1994
	CAII	<b>SNNWVIS..</b>	<i>Pseudomonas</i>	Aramori,1991
	CAIII	<b>SNNWAVA..</b>	<i>Pseudomonas</i>	Matsuda,1987 Aramori,1991
	GL-7ACA	<b>SNSWAV..</b>	<i>Pseudomonas</i>	Lee Y S , 1998
Thr	PRO	<b>TTTEGIT..</b>	Archaeon <i>T. acidophilum</i>	Löwe ,1995
	HsIV	<b>TTIVGVR..</b>	<i>E. coli</i>	Bochtler M.,1997
	AGA	<b>TIGMVVI..</b>	Leucocitos humanos	Oinonen C, 1995 Artymiuk, P, 1995
	GGT	<b>TTHYSIV..</b>	<i>E. coli</i>	Suzuki, 1989
	CAIV	<b>TTHVTVA..</b>	<i>Pseudomonas</i>	Matsuda,1987
Cys	GAT	<b>CGVFGIW..</b>	<i>B. subtilis</i>	Smith ,1994
	PVA	<b>CSSL SIR..</b>	<i>E. coli</i>	Suresh, 1999

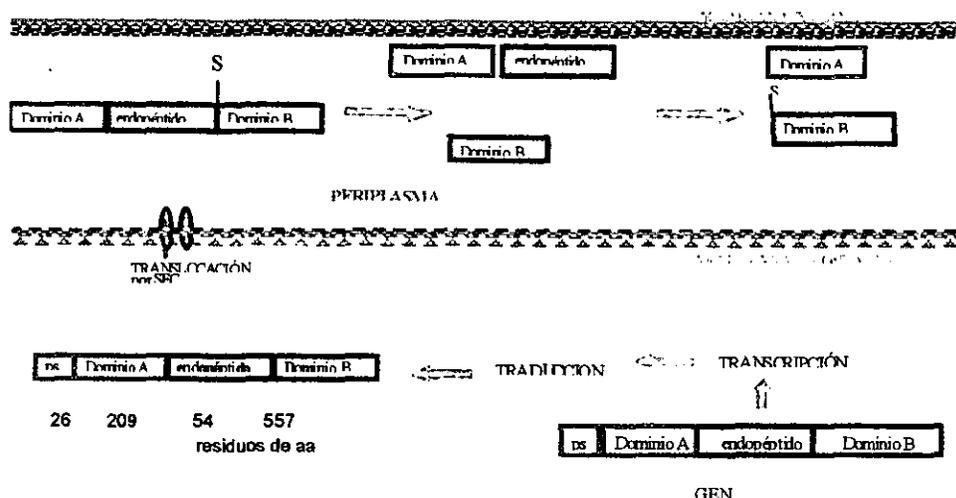
## Maduración post-traducciona de la penicilina acilasa

La penicilina acilasa se sintetiza como un precursor de 95 kD en el citoplasma de la bacteria, el cual sufre dos eventos de maduración (Oliver G. et al, 1985). La translocación del precursor al espacio periplásmico de la bacteria es auxiliado por una chaperona del sistema de translocación sec (Chou P.C. et al, 1999-c) y el péptido señal de 3kD es removido. El propéptido de 92 kD presente en el periplasma (Schumacher et al, 1986) sufre la excisión del endopéptido (figura 4), el primer punto de corte ocurre entre los residuos Thr289 y Ser290 (ser  $\beta$ 1), dejando libre la subunidad B de 62 kD (Slade et al, 1991). El complejo de 30 kD formado por el endopéptido unido a la subunidad A, sufre otra excisión entre los residuos Ala235 y Ala236 dejando libre la subunidad A de 24 kD, finalmente la subunidad A y B se pliegan adecuadamente para obtener un heterodímero activo de 86 kD (figura 4) (Sizmann D. et al, 1990; Lindsay and Pain, 1991).

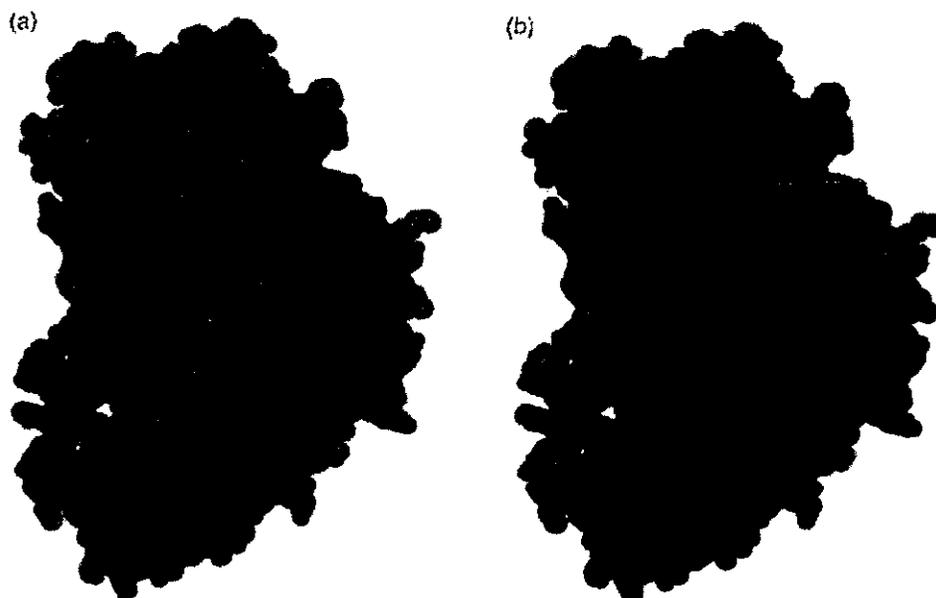
*In vivo*, se ha observado una dependencia de la maduración de la penicilina acilasa de *E. coli* a temperaturas entre 25 y 28 °C, ya que en este intervalo se obtiene la mayor cantidad de proteína madura. A temperaturas superiores a 32 °C se tiene una inactivación total del mecanismo de maduración (Keilmann C. et al, 1993).

La excisión del endopéptido es un mecanismo autocatalítico. Estudios *in vivo* demuestran que la serina 290 ( $\beta$ 1) es esencial para el procesamiento y para la actividad, ya que al mutarla por treonina, arginina o glicina la proteína no puede ser procesada y al ser modificada por cisteína (Bruns J, et al, 1985) puede ser parcialmente procesada pero sin actividad (Choi et al, 1992). En este mecanismo también se involucra la lisina 299 (Lys  $\beta$ 10) que crea un ambiente propicio por el pKa de su cadena lateral. Este residuo se haya conservado en seis penicilina acilasas aisladas de *Escherichia coli*, *Kluyvera cryocrescens*, *Providencia rettgeri*, *Bacillus megaterium*, *Arthrobacter viscosus* y *Alcaligenes faecalis* (Lee H. et al, 2000).

Para investigar el mecanismo autocatalítico en la penicilina acilasa se han hecho mutaciones cercanas al carboxilo terminal del endopéptido con el fin de eliminar el procesamiento. La sustitución de treonina en la posición 263 por glicina permite que el precursor se procese muy ineficientemente, en la estructura cristalográfica de esta mutante denominada T263G (figura 5), se observa que el endopéptido bloquea la entrada a la cavidad del sitio activo de la proteína y como consecuencia la proteína es inactiva (Hewitt et al, 2000).



**Figura 4.** Mecanismo de maduración de la penicilino acilasa de *Escherichia coli*. Una vez traducido el precursor, se transloca al periplasma por el péptido señal de 26 aa, una vez en el periplasma, el endopéptido de 54 aa se excinde por un mecanismo autocatalítico en donde participa directamente la S290 ( $\beta$ 1), para finalmente formar un heterodímero activo.

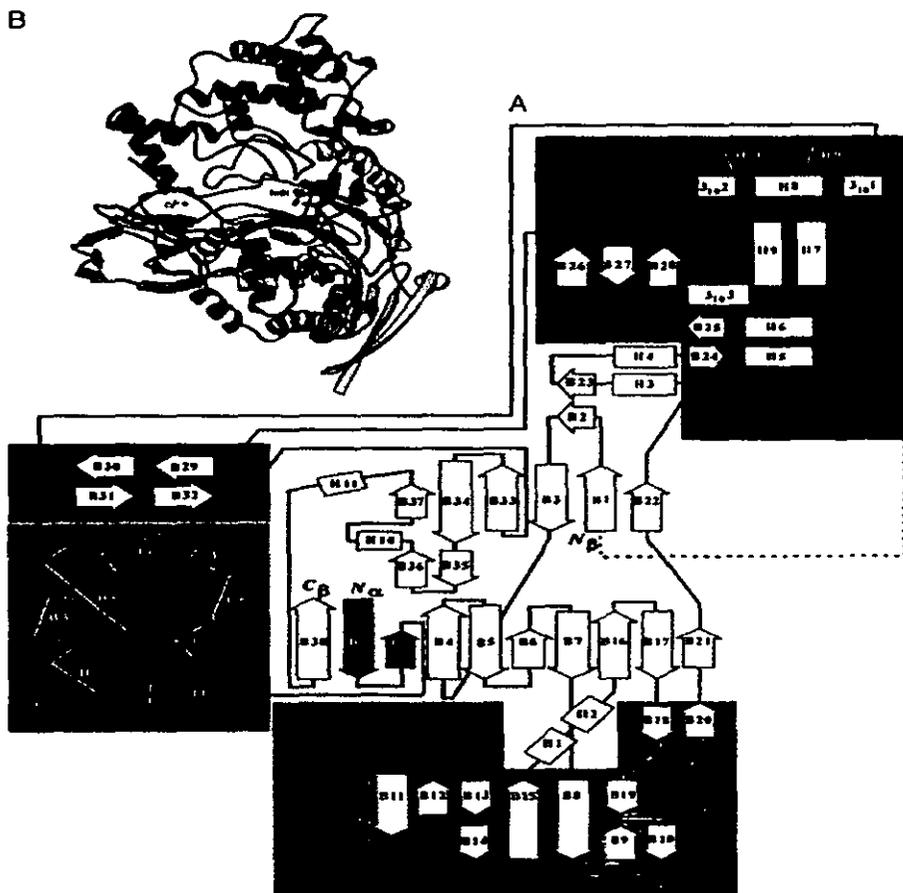


**Figura 5.** Modelo de la estructura de la penicilino acilasa en su estado maduro y sin procesar. a) penicilino acilasa silvestre procesada PDB:1PNK y b) precursor PDB:1E3A. Se puede observar la obstrucción de la cavidad del sitio catalítico por el endopéptido. El endopéptido se indica en color rojo, en azul el dominio B, en verde el dominio A y en amarillo se señala la serina catalítica.

### Características estructurales de la penicilino acilasa

De la estructura tridimensional por difracción de rayos X de la penicilino acilasa G aislada de *E. coli* y *Providencia rettgeri* se determinó que esta enzima posee un plegamiento  $\alpha+\beta$ . La proteína se caracteriza por tener en el centro una cavidad profunda formada por residuos hidrofóbicos una vez madura, donde se encuentra la Ser  $\beta 1$  involucrada en catálisis.

Se distinguen cinco regiones estructurales: un sandwich-beta, dos regiones de  $\alpha$ -hélices un barril parcial tipo beta y una pequeña región de hojas beta. La cavidad hidrofóbica está formada por residuos de las cinco regiones. En el sandwich-beta se encuentran la serina catalítica y la mayoría de los residuos que forman la cavidad hidrofóbica (figura 6).



**Figura 6.** Regiones estructurales de la penicilino acilasa. En amarillo se ilustra el sandwich-beta, dos regiones de  $\alpha$ -hélices en rojo y naranja, un barril parcial de betas en verde, una pequeña región de hojas  $\beta$  en azul. Los elementos de estructura secundaria están designados como rectángulos para  $\alpha$ -hélices o hélices  $3_{10}$  y como flechas para hojas beta. Las conexiones entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  anteriores a la maduración se muestran con una línea punteada. (Tomado de McDonough et al, 1999).

### Mecanismo de acción de la penicilino acilasa

Existen cuatro residuos en el sitio activo de la estructura de la penicilino acilasa Ser  $\beta$ 1(Ser290), Gln  $\beta$ 23 (Gln312), Ala  $\beta$ 69 (Ala358) y Asn  $\beta$ 241 (Asn530) directamente involucrados en la catálisis. Cuando se cataliza la desacilación, la cadena lateral de la Ser  $\beta$ 1 está involucrada en el ataque nucleofílico del grupo acil uniéndose al sustrato, de lo cual se forma un intermediario acil-covalente.

El intermediario tetrahedral cargado negativamente es estabilizado por un oxianión formado por dos nitrógenos, el de la amida de la cadena lateral de la Asn  $\beta$ 241 y el amino de la cadena lateral de la Ala  $\beta$ 69. En este mecanismo interviene una molécula de agua, que se une al nucleófilo O $\gamma$  de la Ser $\beta$ 1 y el grupo  $\alpha$ -amino hace que el O $\gamma$  se vuelva más nucleofílico. Otra molécula de agua también forma puentes de hidrógeno con la amida de la Gln  $\beta$ 23. El grupo  $\alpha$ -amino de la Ser $\beta$ 1 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonil de Gln  $\beta$ 23 y Asn  $\beta$ 41 dando a la unión entre el agua y el oxígeno un carácter más básico. El enlace amido del sustrato es hidrolizado cuando el nucleófilo ataca el oxígeno del grupo carbonil del sustrato, formando un intermediario acil-enzima. El rompimiento del enlace es facilitado por la nueva posición del grupo carbonil del sustrato, que forma el oxianión con el nitrógeno del grupo amida de la Ala  $\beta$ 69 y N $\delta$  de la Asn  $\beta$ 241 (figura 7).

Por otro lado, hay una similitud en el mecanismo catalítico entre la penicilino acilasa y familia de las serin proteasas las cuales hidrolizan enlaces amidas y ester. Ambas utilizan una serina catalítica para hidrolizar el sustrato y forman un intermediario acil-enzima, aunque para llevar a cabo la catálisis las serin proteasas utilizan una triada catalítica formada por una serina, una histidina y un ac. aspártico (Kraut J, 1977), la cual no se ha identificado en la penicilino acilasa.

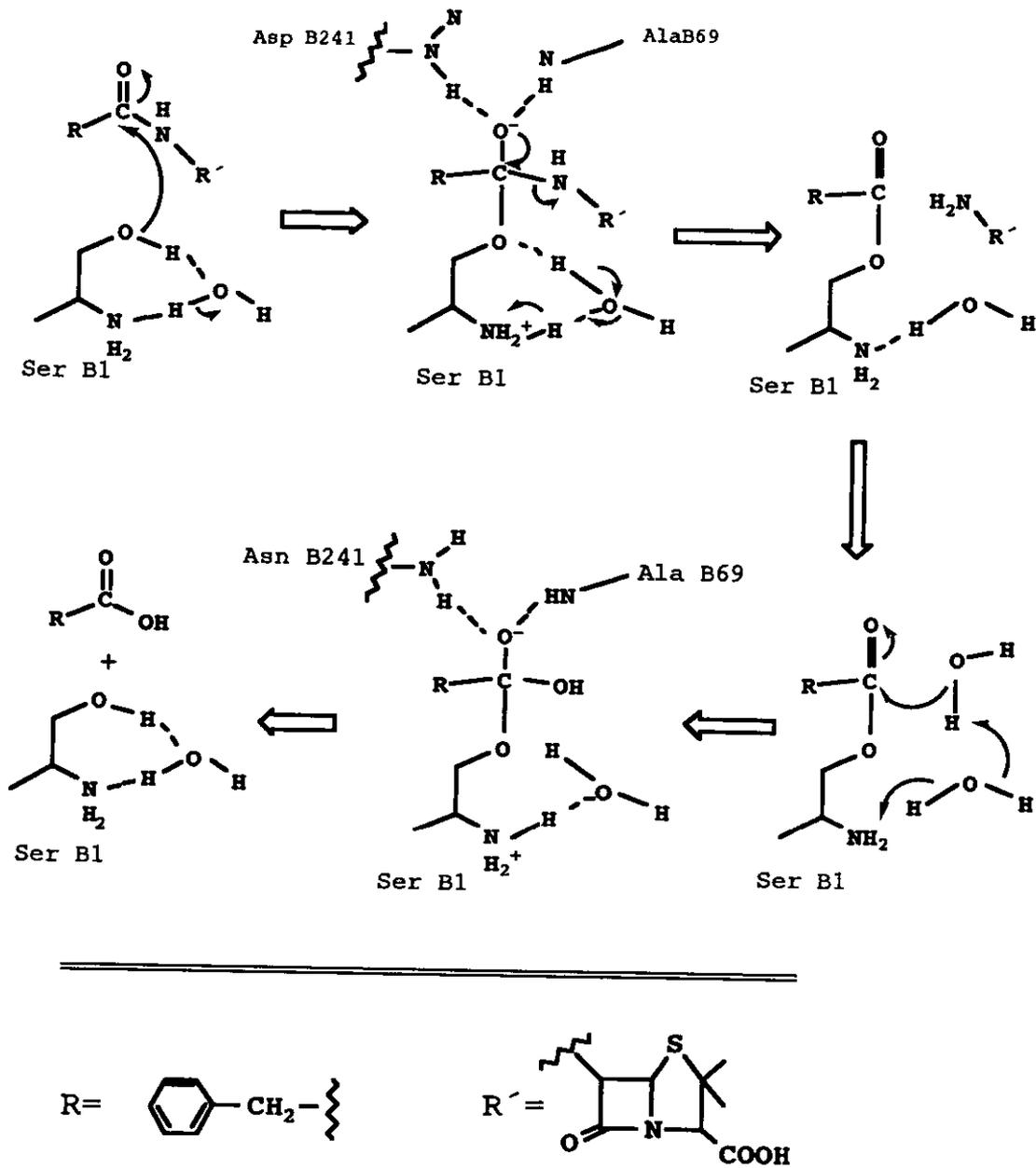


Figura 7. Mecanismo de acción de la penicilino acilasa sobre la penicilina G.

### **Estrategias para optimizar la producción de penicilino acilasa**

Desde su utilización en la obtención de 6-APA se han planteado diferentes estrategias para obtener con mejores rendimientos a la penicilino acilasa, así como la obtención de mutantes que sean más activas. Para producir la proteína con buenos rendimientos se ha abordado el problema desde varios puntos de vista: se han buscado cepas sobreproductoras, se han utilizado diferentes sistemas de expresión y mejorado las condiciones de fermentación para obtener la enzima.

Los factores que se deben considerar en las estrategias de selección de cepas sobreproductoras son mutantes beta-lactamasa negativas (ya que estas enzimas hidrolizan la penicilina G), que produzcan grandes cantidades de penicilino acilasa en forma constitutiva y que sean resistentes a represión catabólica.

Se ha demostrado que la expresión de la enzima penicilino acilasa puede ser regulada a nivel transcripcional, traduccional y en los eventos post-traduccionales, que a su vez están directamente relacionados con el sistema hospedero/vector utilizado (Chou CP, 1999-b). Las causas principales del poco éxito obtenido en la sobreproducción de la penicilino acilasa se mencionan a continuación:

- a) Dado que la síntesis de la enzima es favorecida a bajas temperaturas, los cultivos se hacen a menos de 30 °C lo cual no es óptimo para el crecimiento de *E. coli*.
- b) Los medios de cultivo son usualmente suplementados con Ac. fenilacético para inducir la producción de la proteína, esta adición afecta el crecimiento de *E. coli*.
- c) La glucosa es una buena fuente de carbono para favorecer el crecimiento de *E. coli*, pero la síntesis de la penicilino acilasa se reprime catabólicamente por este azúcar.
- d) Se ha observado que la sobreproducción de la penicilino acilasa afecta negativamente el crecimiento de *E. coli*.
- e) La proteína tiende a formar agregados tanto en el citoplasma como en el espacio periplásmico de la bacteria.
- f) Eliminar el propio sistema de regulación de la enzima, ha repercutido directamente en la obtención de la enzima.
- g) La utilización de un determinado sistema hospedero/vector puede o no favorecer la producción de enzima activa.

Con el fin de encontrar cepas que produzcan mayor cantidad de proteína activa o con cambio de especificidad, se han usado agentes mutagénicos como son radiación UV, N-metil N-nitrosoguanidino (MNNG) (Erarslan A. et al, 1991), etilmetanosulfonato (EMS) ; así como la selección en diferentes fuentes de carbono o nitrógeno (Chou et al, 1999-d). En todos los casos se ha

regulado la temperatura de cultivo. De estos estudios, el grupo de Eraslan en 1991 alcanzó una cepa mutante que produce 570 U/L, alrededor de cuatro veces más que la cepa original ATCC 11105 (180 U/L), pero desafortunadamente no se conocen las mutaciones que dan origen a este fenotipo.

Utilizando tecnología de DNA recombinante, también se ha intentado obtener cepas sobreproductoras de penicilino acilasa. La utilización de diferentes promotores que van desde una fuerza transcripcional débil a fuerte ha indicado que la enzima se expresa mejor con su propio promotor, la introducción de bases de DNA haciendo más largo el espacio entre el sitio de unión a ribosoma y el codón de inicio ATG ha incrementado la eficiencia de la traducción (Chou et al, 1999-d). La clonación del gen *pac* de *E. coli* se ve afectada con la exclusión total de la zona reguladora, pero dejando diferentes fragmentos de esta zona, ha ayudado a mejorar la producción de la enzima (280 U/L) (Chou et al, 1999-b), desafortunadamente la sobreproducción favorece la formación de cuerpos de inclusión en muchos de los casos (Sriubolbas et al, 1997; Scherrer, 1994; Chou et al, 2000) para evitar estos problemas se ha adicionado a los medios de cultivo coadyuvantes como glicerol o sacarosa, los cuales no han resuelto totalmente el problema (Scherrer, 1994; Chou et al, 2000).

Dentro de los sistemas utilizados actualmente y con alta eficiencia de recuperación de la enzima activa ha sido la expresión en levadura, en donde la proteína es excretada al medio de cultivo en contraste con los sistemas bacterianos donde la enzima es retenida en periplasma. Cuando se expresó en *Saccharomyces cerevisiae* el gen de la penicilino acilasa proveniente de *E. coli* y *Providencia rettgeri*, se obtuvieron los más altos rendimientos hasta el momento, pero solo con la de *P. rettgeri* (1500 U/L), ya que con la enzima de *E. coli* los rendimientos fueron muy pobres en este sistema (0.5 U/L) (Ljubijankic et al, 1999). Otro sistema desarrollado con menores rendimientos, han sido un sistema hospedero-vector que ayuda a identificar mutantes sobreproductoras por medio de screening en el antibiótico penicilina G (Chou, et al, 1999-a). También se ha logrado desplegar la penicilino acilasa de *Providencia rettgeri* en la superficie del fago fd, sin embargo, el despliegue de la proteína por el canal de secreción no es muy eficiente, posiblemente por el tamaño de la proteína en el fago fd (Verhaert et al, 1999).

## **HIPOTESIS**

En este trabajo se propone que la generación de la enzima penicilino acilasa en forma activa puede ser independiente del mecanismo post-traduccional donde se excinde un endopéptido, mediante la permutación circular del gen que codifica para la proteína.

## **OBJETIVOS**

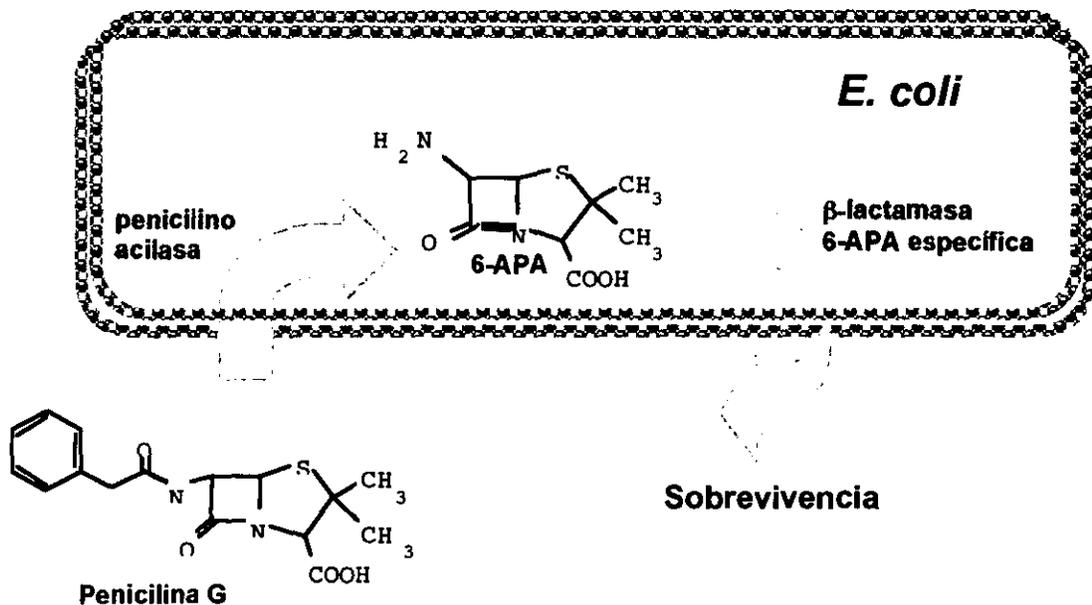
Diseño y obtención de proteínas monoméricas de la penicilino acilasa independientes del mecanismo de maduración post-traduccional.

### **Objetivos específicos**

- \*Diseñar un sistema que permita seleccionar para actividad de penicilino acilasa.
- \*Construir una permutación circular para obtener una enzima monomérica de la penicilino acilasa tratando de mantener la actividad.

### Diseño del sistema de selección de actividad de penicilino acilasa

Para la identificación de mutantes con actividad de penicilino acilasa era necesario contar con un sistema de selección. El sistema planteado en este trabajo, se basa en la capacidad que se le confiere a la bacteria de crecer en presencia de penicilina G cuando se expresa la actividad de penicilino acilasa. La penicilino acilasa puede hidrolizar a la penicilina G y formar ac. 6-aminopenicilánico (6-APA) y ac. fenilacético (AFA). El 6-APA formado, al igual que la penicilina G tiene actividad bactericida. Para identificar a las mutantes era necesario contar primero con una cepa que fuera resistente a 6-APA. Para este fin se utilizó una  $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA, está mutante se obtuvo de la sustitución en la posición 132 de una asparagina por un ac. aspártico. Con este cambio la  $K_{cat}$  de la enzima modificada incrementó hacia 6-APA y disminuyó hacia penicilina G su sustrato natural a pH 7.0 (Osuna et al, 1995). Una vez que a la cepa de *E. coli* se le confirió resistencia a 6-APA por la transformación del plásmido que expresa el gen de esta enzima, se transforma con la biblioteca de variantes y se identifican solo aquellas variantes que tienen actividad de penicilino acilasa directamente por crecimiento sobre medios de cultivo que contienen penicilina G (figura 8).

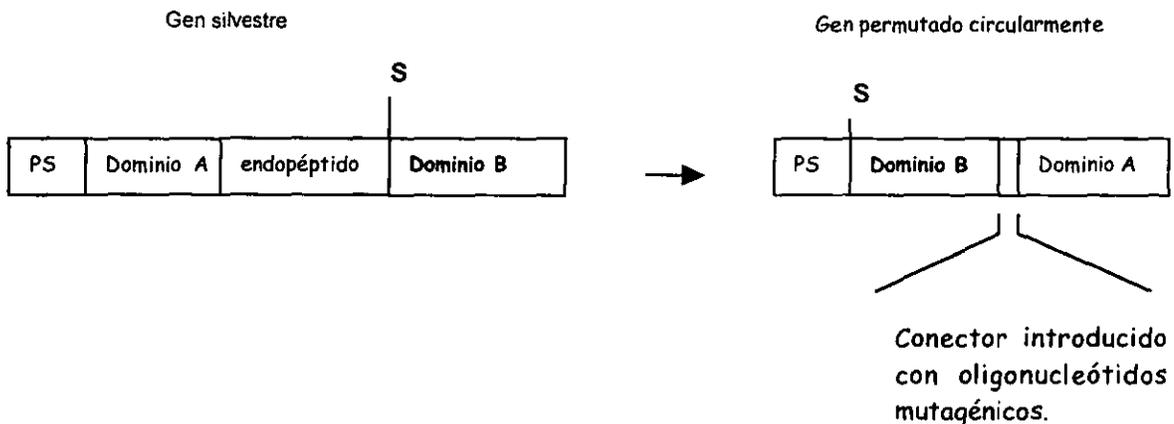


**Figura 8.** Planteamiento del sistema de selección de actividad de penicilino acilasa en la cepa de *Escherichia coli*. La penicilino acilasa al estar presente en la cepa de *E. coli* le permite sobrevivir en penicilina G, de este evento se genera 6-APA un compuesto también tóxico, el cual es transformado por una  $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA a un compuesto que permite la viabilidad de la bacteria.

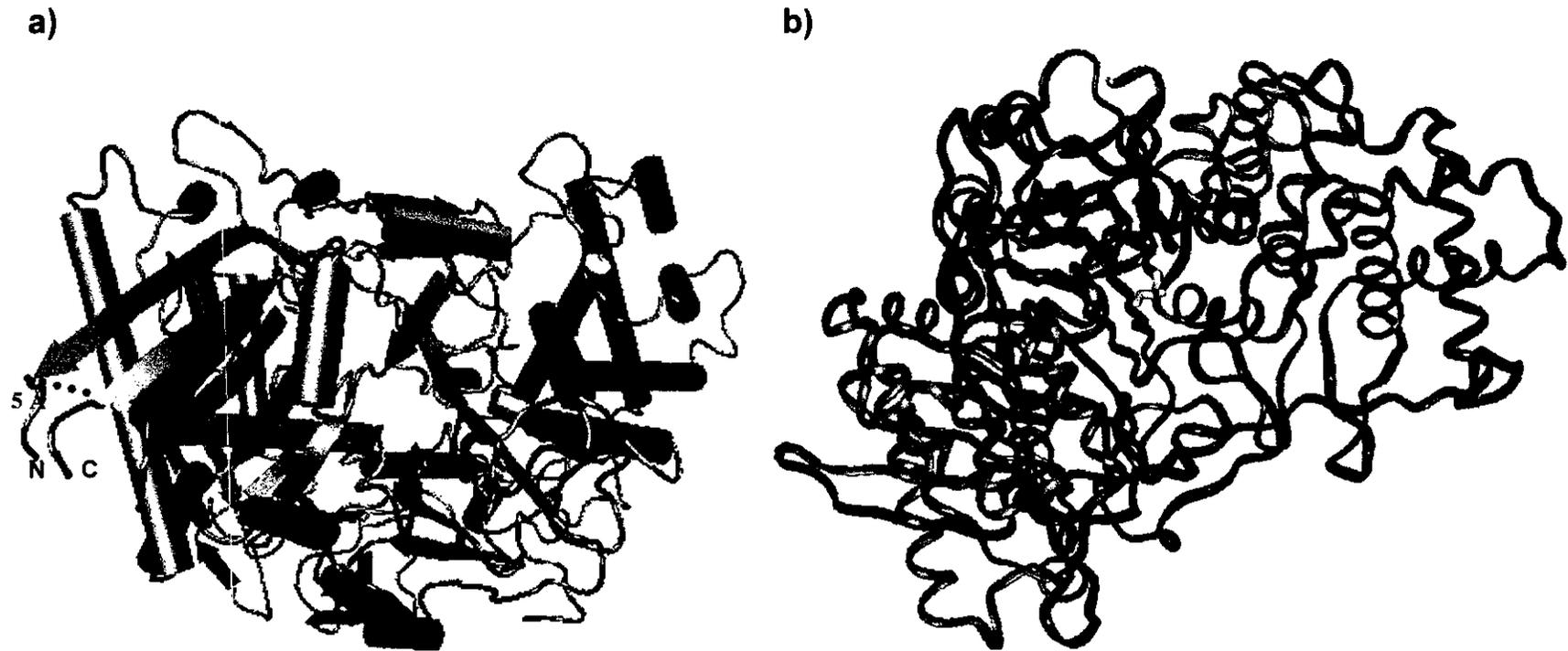
## Diseño de la permutación circular de la penicilino acilasa para obtener variantes monoméricas

Considerando que uno de los principales problemas que presenta esta proteína para obtenerse en forma activa es su procesamiento post-traducciona, se planteó construir una enzima monomérica catalíticamente activa que excluyera este mecanismo. Para este evento era necesario rediseñar el gen de la penicilino acilasa, mediante una permutación circular.

Basándonos en la estructura tridimensional de la penicilino acilasa aislada de *Escherichia coli* resuelta a 1.9 Å (PDB:1PNK), se rasuraron cuatro codones en el extremo 5' del gen y tres codones del extremo 3', utilizando oligos específicos, a modo de dejar las betas plegadas antiparalelas cercanas a los sitios amino y carboxilo terminal íntegras (figura 10-a), en este espacio de alrededor de 5 Å se introdujo a nivel de gen, por medio de oligonucleótidos mutagénicos un conector de cuatro aminoácidos con posibilidad de generar alrededor de  $1 \times 10^6$  variantes monoméricas (figura 10-b). Con este conector se trató de simular una vuelta beta, que es el tipo de estructura más característico en la unión de dos betas plegadas. Para unir los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína próximos en la estructura tridimensional pero separados a nivel de estructura primaria, fue necesario hacer una permutación circular a nivel de las secuencias que codifican para los dos dominios de la proteína y eliminar la secuencia que codifica para el endopéptido, los nuevos sitios amino y carboxilo terminal en esta proteína corresponden a los que se generan en la excisión del endopéptido (figura 9).



**Figura 9.** Representación de la permutación circular del gen de la penicilino acilasa. Como resultado de la permutación circular la enzima penicilino acilasa se expresa como un monómero, el cual ya no sufre la excisión del endopéptido para poder ser activo, pero sí tiene la capacidad de translocarse a periplasma. PS: representa el péptido señal de localización a periplasma y S representa a la serina catalítica.



**Figura 10.** a) Representación de la estructura secundaria de la penicilino acilasa madura, en verde se representa a las estructuras betas plegadas y en azul a las  $\alpha$ -hélices y asas. El grupo amino y carboxilo terminal se encuentran formando parte de dos betas plegadas antiparalelas, se enmarca en color rojo la distancia de 5 Å entre los aminoácidos en donde se introdujo el conector (realizado en el programa VMD 1.5) b) Modelo tridimensional propuesto para la penicilino acilasa monomérica con secuencia **NEGM**. En color gris se representa al dominio A y en azul al dominio B, en amarillo se denota a la serina catalítica y en rojo el conector de cuatro aminoácidos introducido (realizado en el programa Insight II Biosym Technologies, Inc.)

**MATERIALES Y METODOS****Medios y soluciones****Medio Luria-Bertani (LB)**

Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	10g
Bactoagar	5g

Aforar a un litro, ajustar pH a 7.0 y esterilizar a 15 lb/ in<sup>2</sup> de presión por 20 min.

El medio líquido es equivalente excepto por el bactoagar.

**Medio SOC**

Triptona	10g
Extracto de levadura	2.5g
NaCl (1M)	5mL
KCl (1M)	1.25mL
Glucosa (2M)	50 µL
MgSO <sub>4</sub> (1M)	50 µL

Aforar a 500mL, ajustar pH a 7.0 y esterilizar a 15 lb/ in<sup>2</sup> de presión por 20 min.

**Medio mínimo M9**

Sales M9 10X	0.1%
Glucosa	0.2%
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.001M
Tiamina	0.001%
Casaminoácidos	6.24%
Glicerol	10.0%
Cloramfenicol(20 mg /mL)	1mL
Ampicilina (200 mg/mL)	1mL

Aforar a un litro con agua miliQ estéril. Todos los reactivos excepto las sales M9 se esterilizaron por filtración en poro de 0.22 micras (Millipore).

**Sales M9 10x**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30g
NaCl	5g
NH <sub>4</sub> Cl	10g

Aforar a un litro con H<sub>2</sub>O miliQ y esterilizar a 15 lb/ in<sup>2</sup> de presión por 20 min.

**Buffer de Tris borato (TBE) 10X**

108 g Tris base
55 g Ac. bórico
20 mL 0.5M EDTA pH 8.0

Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ.

**Buffer PBS 1X**

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g

Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O milliQ, ajustar pH a 7.4 y esterilizar a 15 lb/ in<sup>2</sup> de presión por 20 min.

## Cepas

<i>E. coli</i> JM101	utilizada para la selección de proteínas con actividad de penicilino acilasa.
<i>E. coli</i> XL1-Blue	cepa de alta eficiencia de transformación utilizada para recuperar las mutantes y hacer la cepa de selección.
<i>E. coli</i> HB101PAC	tiene mutaciones a nivel cromosomal no identificadas que la hace resistente a 6-APA (Chou, et al 1999).
<i>E. coli</i> BL21 DE3	contiene la polimerasa del fago T7 para complementar con el promotor de T7 del vector pET. Esta cepa fue utilizada para sobreexpresar las proteínas permutadas circularmente.

## Secuenciación

Para las secuencias se purificó plásmido de la construcción a determinar con el kit de purificación de plásmido de Boehringer (High Pure TM Plasmid Isolation Kit). El volumen final de la reacción de secuencia fue de 16  $\mu$ L, en donde aproximadamente se puso 1  $\mu$ g de plásmido y 5 pmolas/ $\mu$ L del oligo adecuado. Todas las secuencias se hicieron en el secuenciador automático Perkin-Elmer 377-18; él cual detecta la fluorescencia de los cuatro diferentes fluoróforos usados como terminadores de la reacción para identificar las reacciones de extensión de las bases nucleóticas A, G, C, y T. Cada fluoróforo se excita a diferentes longitudes de onda cuando se exponen al rayo láser y de esta forma las cuatro emisiones pueden ser detectadas y distinguidas en un solo carril del gel (ABI PRISM, 1995)

## Purificación de oligonucleótidos

Todos los oligos utilizados en este trabajo fueron purificados en gel de poliacrilamida- 8 M UREA, la electroforesis se realizó a 250 V en buffer TBE 1X, la banda fue identificada por radiación UV y cortada, el oligo se eluyó del gel en H<sub>2</sub>O por 12 h a 37 °C, posteriormente se secó en el Savant por 30 min y se resuspendió en H<sub>2</sub>O bidestilada, finalmente se cuantificó su concentración en el espectrofotómetro a 280 nm.

## Electrotransformación

El plásmido o ligación a electroporar se mezclaron con las células competentes adecuadas preparadas de acuerdo al protocolo descrito por Maniatis en 1989, en una celda de electroporación de 1 mm (Biorad), posteriormente se les aplicó un pulso de 1.8 KV en un electroporador de BIORAD GENE PULSER. Después del pulso las células se recuperaron en 1mL de medio SOC e incubaron a 37 °C durante una hora para posteriormente sembrarse sobre medio sólido LB con los antibióticos adecuados.

**Construcción de las cepas de selección para actividad de penicilino acilasa****Subclonación del gen de la  $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA**

Este gen se subclonó bajo los promotores silvestre y *trc* en el plásmido pACYC 184 (figura 11), el gen fue obtenido a partir de construcciones previas de los plásmidos pT4 Km<sup>r</sup> y pKGS Km<sup>r</sup>. Los oligos que flanqueaban al gen en los diferentes promotores se describen a continuación.

**Promotor *trc***

38PT4BAM 5'CTGCAGGGATCCTATCAAGCGGCCGCACTAGT 3'

32PT4SAL 5'GAGGTCGTCGACGCGCCGACATATAAACGGTT 3'

**Promotor silvestre *bla***

38BAMH1 5'CTGCAGGGATCCTCATTACCAATGCTTAATCAGTGAGG 3'

32SAL 5'GAGGTCGTCGACTCTTGAAGACGAAAGGGCCT 3'

**Condiciones para la PCR**

DNA 200 ng  
 Buffer de PCR 1X 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl 8.3 (Perkin-Elmer)  
 DNTP's 2.5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Perkin-Elmer)  
 Oligo 5'-3' 20 pmol  
 Oligo 3'-5' 20 pmol  
 MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Perkin-Elmer)  
 Taq polimerasa 2.5 U  
 H<sub>2</sub>O bidestilada a completar 100  $\mu$ L de reacción final

**Programa en el termociclador para amplificar el gen de la  $\beta$ -lactamasa 6-APA específica**

No. ciclos	94 °C	55 °C	72° C
1	7'	—	—
5	2'	2'	2'
20	1'	2'	2'
1	—	—	10'

El producto de PCR se purificó por gel de agarosa al 2% utilizando el kit de Qiagen con las condiciones ahí mencionadas, se digirió un 1  $\mu$ g del producto con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I en el buffer adecuado según Boehringer a 37 °C durante 12 h, posteriormente se purificó con el kit de producto de PCR de Boehringer con las condiciones ahí descritas. Una vez purificados los fragmentos de DNA se verificó su concentración aproximada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.



crecidos los cultivos, se purificó el plásmido pACYC 184 con los dos diferentes insertos utilizando el kit de Boehringer (High Pure TM Plasmid Isolation Kit) con el protocolo ahí propuesto. Se verificó que presentaran el inserto mediante análisis de restricción.

#### **Selección de clonas de las cepas XL1-Blue y JM101 transformadas con la $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA .**

1  $\mu$ L de cada plásmido superenrollado se utilizó para electroporar 5  $\mu$ l de células XL1-Blue o JM101 electrocompetentes, después de la recuperación se sembraron a 30°C en medio LB sólido con los siguientes antibióticos: Cm 20  $\mu$ g/mL, Cm 20  $\mu$ g/mL con 6-APA o P.G. a diferentes concentraciones. De aquí se escogió una clona bajo promotor silvestre y se retransformó en las cepas XL1-Blue y JM101 por los procedimientos antes descritos y finalmente resultaron en las cepas XL1-Blue PACYCPKGS-9 o JM101 PACYCPKGS-9 de las cuales se hicieron células electrocompetentes.

#### **Construcción de la penicilino acilasa bajo promotor *trc* y *blac***

Para amplificar por medio de PCR el gen se utilizaron los oligonucleótidos NCOPA que introduce un sitio de restricción Nco I y el 28CB que introduce un sitio de restricción Xho I en el extremo 3' del gen.

NCOPA	5'GGC CCA TGG AAA ATA GAA ATC GTA TGA TCG TG 3'
28 CB	5'CCG GCT CGA GTT ATC TCT GAA CGT GCA A 3.'

Una vez amplificado el fragmento de PCR, se purificó de gel de agarosa al 1.5% utilizando el kit de Qiagen con las condiciones ahí mencionadas. El fragmento se digirió con 3  $\mu$ L de la enzima *Xho* I en un buffer adecuado según Bøehringer. Se hicieron digestiones parciales con 0.3  $\mu$ L de la enzima *Nco* I por 5 minutos, posteriormente se purificó el fragmento de 2400 pb digerido parcialmente de gel de agarosa al 1.5% por el kit de Qiagen.

Se realizó una reacción de ligación con aproximadamente 100 ng de cada vector y 200 ng del inserto en un volumen final de 20  $\mu$ l con ligasa del fago T4 en el buffer adecuado según Bøehringer. La ligación se incubó por 30 min a 30 °C, posteriormente el DNA fue precipitado con butanol y centrifugado por 10 min a 15,000 rpm. La pastilla de DNA se secó en el Savant por 10 min y se resuspendió en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril, de los cuales 3  $\mu$ L se utilizaron para electroporar 5  $\mu$ l de células XL1-Blue electrocompetentes, posteriormente a la recuperación se sembraron en cajas Petri con medio LB sólido y 25  $\mu$ g/ mL de km a 28 °C por 12 h. Se crecieron tres colonias de cada caja en medio LB líquido y 25  $\mu$ g/ mL de Km por 24 h a 28 °C. A

partir de estos cultivos se purificó plásmido y se verificó el inserto por patrones de digestión. Se secuenció un plásmido de cada construcción para verificar la integridad de los promotores.

### **Validación del intervalo dinámico de las cepas de selección de actividad de penicilino acilasa**

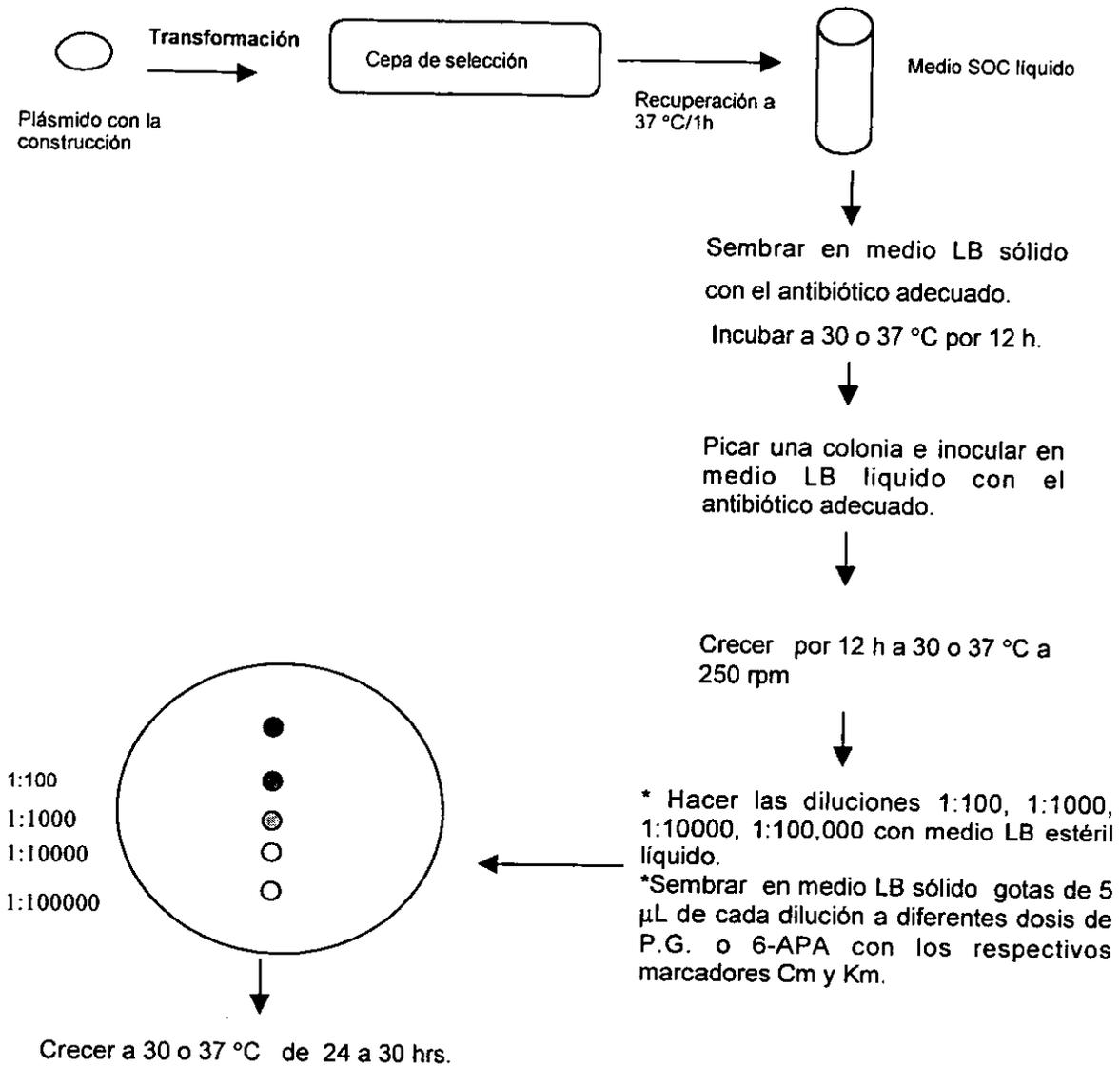
Para validar las diferentes cepas de selección se hicieron ensayos de MIC (concentración mínima inhibitoria) con y sin el gen silvestre de la penicilino acilasa como se describe en la siguiente estrategia.

#### **Ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC's)**

1  $\mu$ L de un plásmido que contiene al gen de interés, se utilizó para electroporar 5  $\mu$ l de células electrocompetentes XL1-Blue PACYCPKGS-9 o JM101 PACYCPKGS-9, mediante un pulso de 1.8 KV en una celda para electroporar de 1mm en un electroporador BIORAD GENE PULSER. Después del pulso, las células se recuperaron en 1mL de medio SOC e incubaron a 37 °C durante una hora antes de sembrarlas a 30 °C en el medio sólido LB con Cm 20  $\mu$ g/mL por 12 h. Se seleccionaron algunas colonias y se inocularon medios LB líquidos con los respectivos marcadores. Una vez obtenidos los cultivos se hicieron diluciones 1:100, 1:1000, 1:10,000, 1:100,000 con medio LB líquido estéril y se sembraron gotas de 5  $\mu$ L en cajas previamente preparadas con diferentes dosis de antibióticos de P.G. y 6-APA y se incubaron a 30 o 37° C según el ensayo, por las horas necesarias hasta que se vean las colonias. Para cada ensayo se realizó una caja Petri control con medio LB con 20  $\mu$ g/mL de Cm y 25  $\mu$ g/mL de km (figura 12). Las concentraciones utilizadas en las cajas Petri con 25 mL de medio LB sólido para este tipo de ensayo normalmente se hicieron en el intervalo para 6-APA de 10 a 290  $\mu$ g/mL a partir de un a solución patrón de 2.5 mg/mL y para P.G. de 10 a 200  $\mu$ g/mL

#### **Ensayos en la cepa HB101 PAC**

1  $\mu$ L de un plásmido que contiene al gen de la penicilino acilasa silvestre bajo el promotor *trc* o silvestre, se utilizó para electroporar 30  $\mu$ l de células electrocompetentes HB101PAC, una vez recuperadas se sembraron a 28°C en medio sólido LB con 25  $\mu$ g/mL de km por 12 h. De las colonias obtenidas se picó una colonia de cada transformación y se inocularon en medio líquido LB con 25  $\mu$ g/mL de km por 12 h. Con estos cultivos se hicieron ensayos de MIC'S.



**Figura 12.** Esquema general para el ensayo de concentraciones mínimas inhibitorias MIC.

**Estrategias para la obtención de la biblioteca de permutaciones circulares de la penicilino acilasa**

Primera estrategia: Para obtener las permutaciones circulares de la penicilino acilasa, se reensambló el gen como se indica en la figura 13.

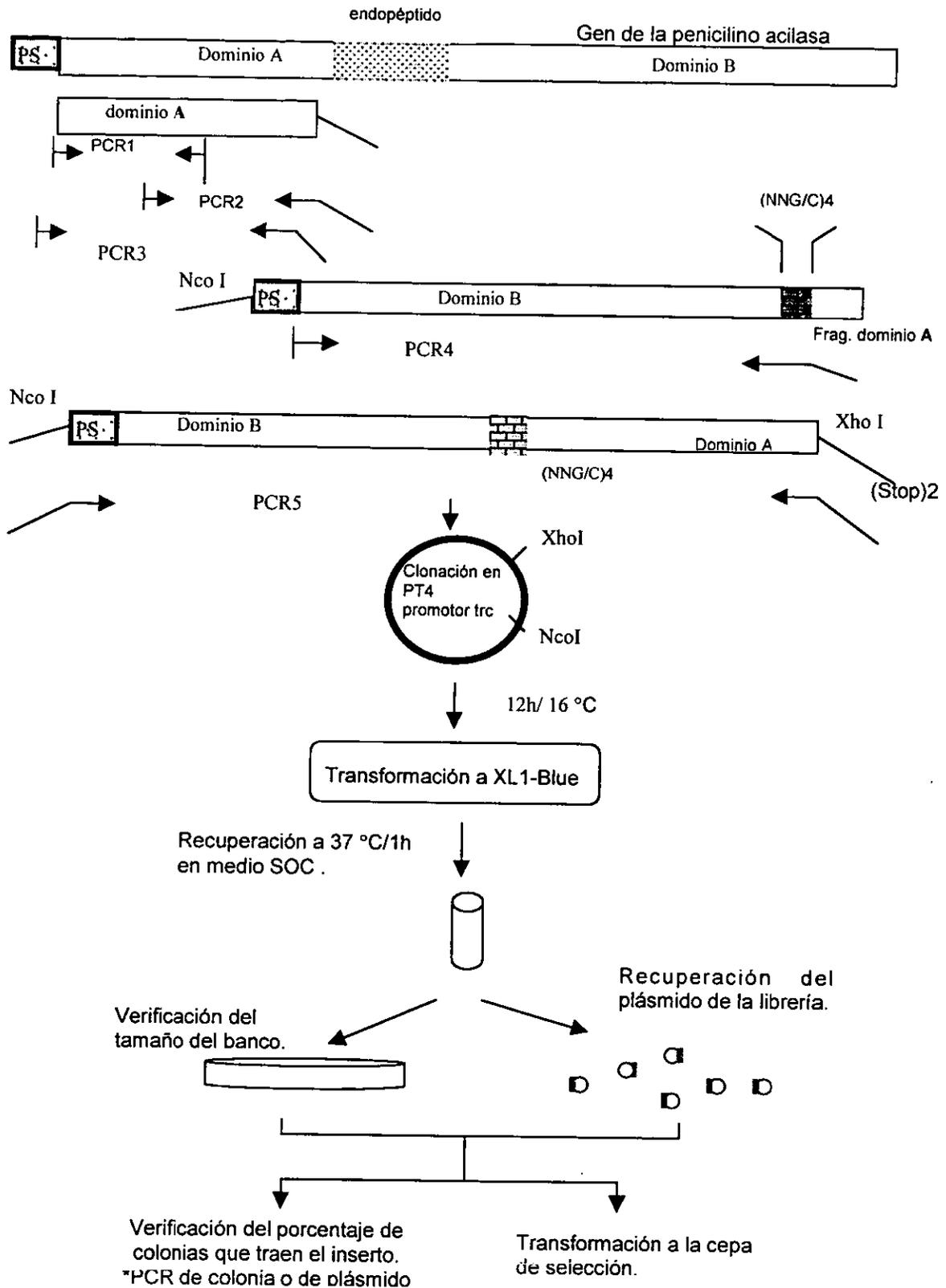


Figura 13. Primera estrategia para la construcción de la biblioteca de permutaciones circulares del gen de la penicilino acilasa de *E. coli*.

Para amplificar los diferentes fragmentos del gen de la penicilino acilasa se utilizaron los siguientes juegos de oligonucleótidos.

PCR1	18NA 27NCO	5' AGT GAG ATA AAG ATT GTT 3' 5'GCG GTT TGC CAT AGT GCC CAC AAA TAT3'
PCR2	25 NCO 31CA	5'GGG CAC TAT GGC AAA CCG CTT CTC T3' 5'CCG GCT CGA GTC ATT ATG CTG TTT GCG AGT T3'
PCR3	18NA 31CA	5' AGT GAG ATA AAG ATT GTT 3' 5'CCG GCT CGA GTC ATT ATG CTG TTT GCG AGT T3'
PCR4	SP47NB 45BLINKCB	5'CTA GCA ATA TGT GGG TG3' 5'AAC AAT CTT TAT CTC ACT SNN SNN SNN SNN AAC GTG CAA CAC TTC3'

SNN= Introduce un aminoácido con variabilidad. En las dos primeras posiciones las cuatro bases nucleotídicas y en la tercera solo guanina y citosina.

**PCR5**

NCO-SP	5'CGG GCC ATG GCT ATT CAA CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT CCC TTT TTT GCG GCA TTT3'
31CA	5'CCG GCT CGA GTC ATT ATG CTG TTT GCG AGT T3'

Los templados utilizados en las diferentes PCR se describen a continuación:

PCR1	PCR2	PCR3	PCR4	PCR5
DNA plásmidico que contiene al gen de la penicilino acilasa.	DNA plásmidico que contiene al gen de la penicilino acilasa.	Se utilizaron los productos de PCR1 y PCR2 previamente purificados.	DNA plásmidico que contiene al gen de la penicilino acilasa.	Se utilizaron los productos de PCR3 y PCR4 previamente purificados.

Condiciones para la PCR1, PCR2 y PCR4 realizadas en una maquina Perkin Elmer, modelo Gene Amp PCR system 9700.

- DNA 50 ng
- Buffer de PCR 1X 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl 8.3 (Perkin-Elmer)
- DNTP's 2.5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Perkin-Elmer)
- Oligo 5'-3' 20 pmol
- Oligo 3'-5' 20 pmol
- MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Perkin-Elmer)
- Taq polimerasa 2.5 U
- H<sub>2</sub>O bidestilada a completar 100 µL de reacción final

Condiciones para la PCR3 y PCR5 realizadas en una maquina Perkin Elmer, modelo Gene Amp PCR system 9700.

- DNA 200 ng
- Buffer de PCR 1X 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl 8.3 (Perkin-Elmer)
- DNTP's 2.5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Perkin-Elmer)
- Oligo 5'-3' 20 pmol
- Oligo 3'-5' 20 pmol
- MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Perkin-Elmer)
- Taq polimerasa 2.5 U
- H<sub>2</sub>O bidestilada a completar 100 µL de reacción final

**Programa en el termociclador para amplificar PCR1**

No. ciclos	94 °C	35 °C	72° C
1	3'	--	--
25	1'	1.5'	2'
1	--	--	10'

## Programa en el termociclador para amplificar PCR2

No. ciclos	94 °C	40 °C	55 °C	72° C
1	5'	--	--	--
5	2'	2'	--	2'
20	2'	--	2'	2'
1	--	--	--	10'

## Programa en el termociclador para amplificar PCR3

No. ciclos	94 °C	50 °C	55 °C	72° C
1	3'	--	--	--
5	1'	2'	--	2'
20	1'	--	2'	2'
1	--	--	--	10'

## Programa en el termociclador para amplificar PCR4

No. ciclos	94 °C	35 °C	55 °C	72° C
1	5'	--	--	--
5*	1'	1'	--	2'
20*	1'	--	1'	2'
1	--	--	--	10'

\* con rampa en un 60%.

## Programa en el termociclador para amplificar PCR5

No. ciclos	94 °C	45 °C	55 °C	72° C
1	5'	--	--	--
5	2'	2'	--	2'
20	2'	--	2'	2'
1	--	--	--	10'

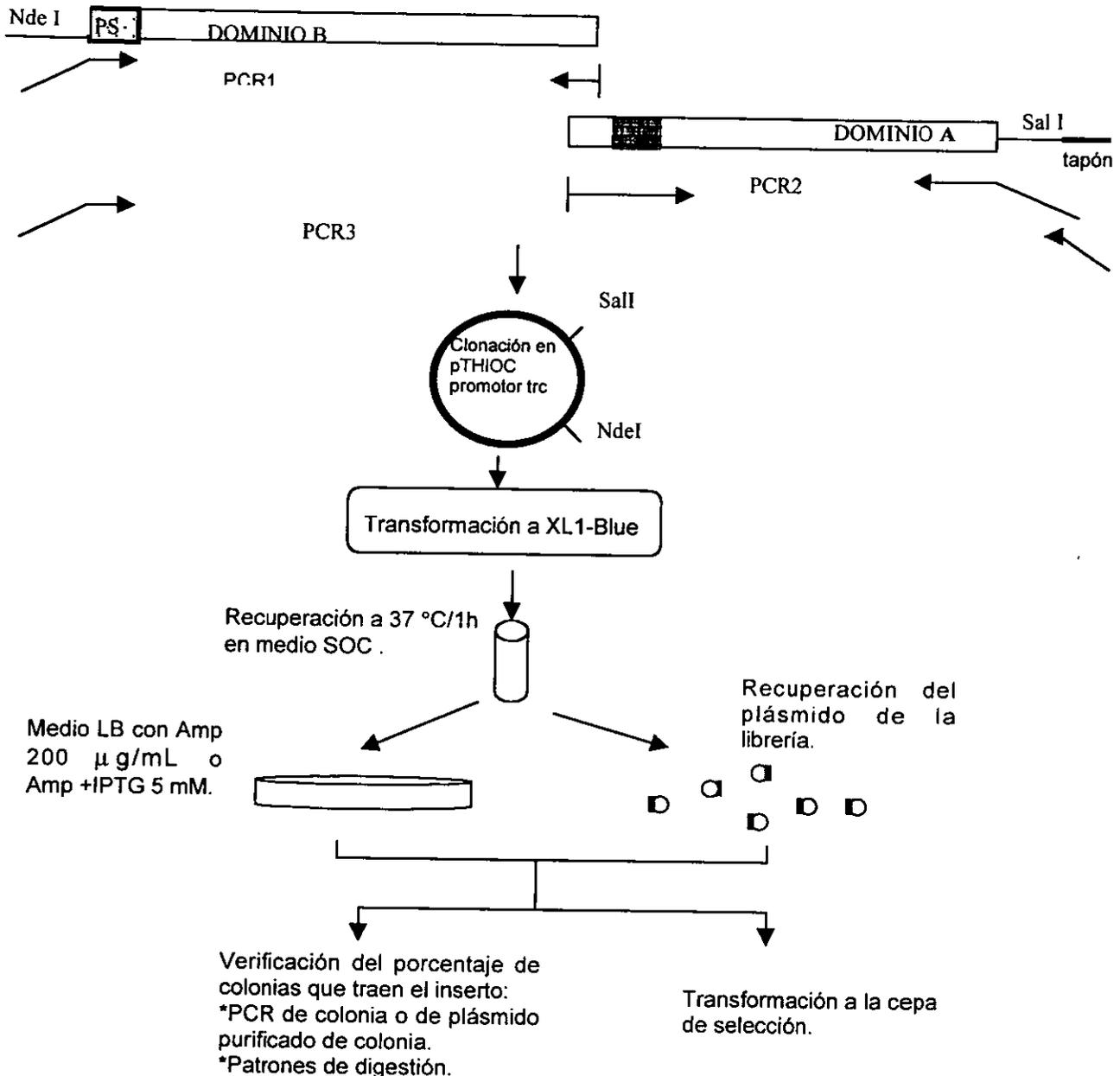
Todos los productos de PCR's se purificaron en gel de agarosa al 1.5% utilizando el kit de Qiagen con las condiciones ahí mencionadas. Alrededor de 5 µg del producto de PCR5 se digirió con las enzimas de restricción Nco I y Xho I por 12 h según las condiciones de Boehringer y se purificó el fragmento con el kit de producto de PCR de Boehringer.

Alrededor de 5 µg de plásmido PT4 promotor *trc* se digirieron con las enzimas de restricción Nco I, Xho I y Eco RV por 12 h según las condiciones de Boehringer, posteriormente se purificó el fragmento en gel de agarosa al 1.5% con el kit de Qiagen.

Se realizó una reacción de ligación con aproximadamente 500 ng de vector y 1 µg del inserto en un volumen final de 40 µl con 1µl de ligasa del fago T4 en el buffer adecuado según Boehringer por 12 h a 16 °C, posteriormente el DNA fue precipitado con butanol y centrifugado por 10 min a 15,000 rpm. La pastilla de DNA se secó en el Savant por 10 min y se resuspendió en 10 µL de H<sub>2</sub>O estéril, de los cuales 5 µL se utilizaron para electroporar 30 µL de células XL1-Blue electrocompetentes, después de la recuperación se sembró 1 µL en medio LB sólido con km 25 µg/mL a 30 °C, el resto se recuperó en 10 mL de medio LB sólido con km 25 µg/mL y se crecieron a 30 °C por 12 h. Se purificó el plásmido proveniente del medio líquido por el kit de plásmido de Boehringer según el protocolo ahí descrito. Se verificó la concentración aproximada del plásmido, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Aproximadamente 100 ng

de plásmido del banco se electroporó en 30  $\mu\text{L}$  de la cepa de selección pACYCPKGS-9 XL1-Blue, después de la recuperación se sembraron en cajas de medio LB con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cm, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de km y P.G en un intervalo de 60 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Segunda estrategia: Para amplificar los genes permutados de la penicilino acilasa, el procedimiento se indica en la figura 14.



**Figura 14.** Construcción de la biblioteca de genes permutados de la penicilino acilasa por la segunda estrategia.

Para el reensamblado de los diferentes fragmentos del gen de la penicilino acilasa se utilizaron los siguientes juegos de oligos.

PCR1	
PSNde	5'GGG CCA TAT GAG TAT TCA ACA TTT CCG TGT CGC CCT TAT TCC CTT TTT TGC GGC ATT T3'
20BC	5'GCA ACA CTT CCT GCG ACT CC3'
PCR2	
ACLINK	5'CGCAGG AAG TGT TGC ACGTT N NSN NSN NSN NSAGT GAG ATA AAGATTGTT3'
39ACTAP	5'AGC CGT GGA TCG TGG ACT AGT TCA TTA AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC GTA CGG GTA TGC TGT TTG CGA3'
PCR3	
NDENEW	5'GGA ATT TCC ATA TGA GTA TTC AAC ATT TCC G3'
TAIL20	5'GGAATAGCCCGTGGATCGTGG3'

Los templados para las diferentes PCR se indican a continuación.

PCR1	PCR2	PCR3
DNA plásmidico que contiene al gen silvestre de la penicilino acilasa.	Producto de primera PCR3 de la estrategia purificado por agarosa 1% por el kit de Qiagen.	Se utilizaron los productos de PCR1 y PCR2 previamente purificados por gel de agarosa 1% por el kit de Qiagen.

Condiciones para la PCR, realizadas en una maquina Perkin Elmer, modelo Gene Amp PCR system 9700.

DNA 100 ng  
 Buffer de PCR 1X 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl 8.3 (perkin-elmer)  
 DNTP's 2.5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP (perkin-elmer)  
 Oligo 5'-3' 20 pmol  
 Oligo 3'-5' 20 pmol  
 MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (perkin-elmer)  
 Taq polimerasa 2.5 U  
 H<sub>2</sub>O bidestilada a completar 100 µL de reacción final

Programa en el termociclador para amplificar PCR1

No. ciclos	94 °C	50 °C	55 °C	72° C
1	5'	--	--	--
5	1.5'	1.5	--	2'
20	1'	--	2'	2'
1	--	--	--	10'

Programa en el termociclador para amplificar PCR2

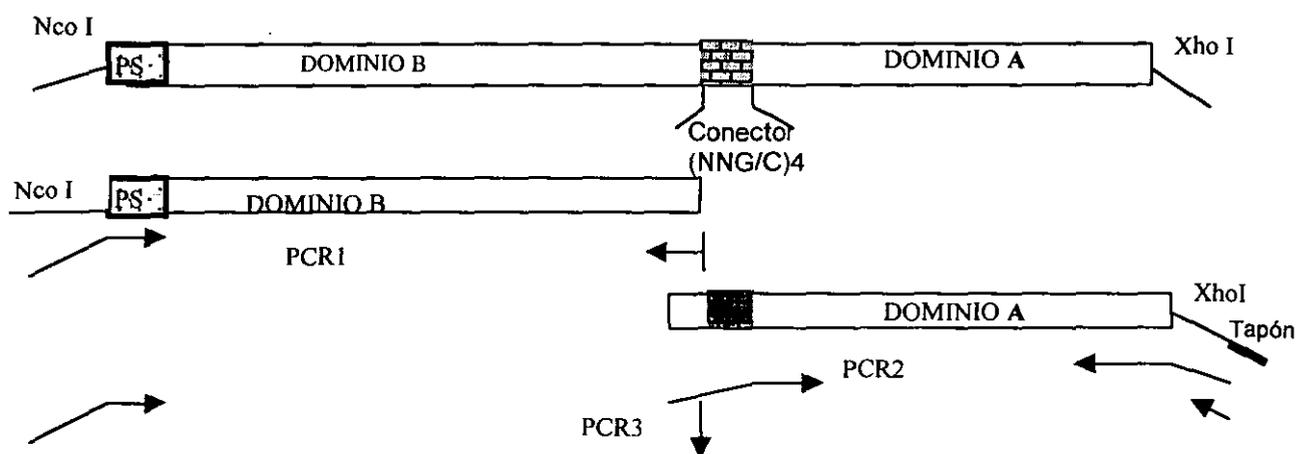
No. ciclos	94 °C	55 °C	72° C
1	5'	--	--
20	1'	2'	2'
1	--	--	10'

Programa en el termociclador para amplificar PCR3

No. ciclos	94 °C	50 °C	55 °C	72° C
1	5'	--	--	--
5	1.5'	1.5'	--	2'
20	1'	--	2'	2'
1	--	--	--	10'

Todos los productos de PCR's se purificaron en gel de agarosa al 1.5% utilizando el kit de Qiagen con las condiciones ahí mencionadas. Alrededor de 5  $\mu$ g del producto de PCR3 se digirió con las enzimas *Nde*I y *Sal*I por 12 h según las condiciones de Boehringer y se purificó el fragmento con el kit de producto de PCR de Boehringer. Alrededor de 5  $\mu$ g de plásmido pTHIOC promotor *trc* se digirieron con las enzimas de restricción *Nde*I, *Sal*I y *Eco*RI por 12 h según las condiciones de Boehringer, posteriormente se purificó el fragmento en gel de agarosa al 1.5% con el kit de Qiagen. Se verificó la concentración aproximada del vector, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Se realizó una reacción de ligación con aproximadamente 320 ng de vector y 200 ng del inserto en un volumen final de 30 con 1  $\mu$ l de ligasa del fago T4 en el buffer adecuado según Boehringer por 12 h a 16 °C, posteriormente el DNA fue precipitado con butanol y centrifugado por 10 min a 15,000 rpm. La pastilla de DNA se secó en el Savant por 10 min y se resuspendió en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril, de los cuales 5  $\mu$ L se utilizaron para electroporar 30  $\mu$ L de células XL1-Blue electrocompetentes, posteriormente de la recuperación se sembraron por duplicado 1  $\mu$ L en medio LB sólido con Amp 200  $\mu$ g/mL a 30 °C y 1  $\mu$ L en medio LB sólido con Amp 200  $\mu$ g/mL + IPTG 0.5 mM, el resto se recuperó en 10 mL de medio LB sólido con Amp 200  $\mu$ g/mL y se crecieron a 30 °C por 12 h. Se purificó el plásmido proveniente del medio líquido por el kit de plásmido de Boehringer según el protocolo ahí descrito. Se verificó la concentración aproximada del plásmido, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

Tercera estrategia: El procedimiento para el reensamblado de los genes permutados circularmente se describe en la figura 15.



Una vez que se tenía la biblioteca de los genes permutados se clonó en el vector pT4 bajo promotor *blac* y posteriormente se siguió la metodología de la primera estrategia a partir de la transformación de la cepa XL1-Blue.

**Figura 15.** Tercera estrategia para la obtención de los genes permutados circularmente de la penicilino acilasa.

Los oligonucleótidos utilizados en la tercera estrategia para el reensamblado de los genes permutados circularmente de la penicilino acilasa se describen a continuación.

## PCR1

NCO-SP 5'CGG GCC ATG GCT ATT CAA CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT CCC TTT  
TTT GCG GCA TTT3'

20BC 5'GCA ACA CTT CCT GCG ACT CC3'

## PCR2

39ACTAP 5'AGC CGT GGA TCG TGG ACT AGT TCA TTA AGA AGC GTA GTC CGG AAC  
GTC GTA CGG GTA TGC TGT TTG CGA3'

ACLINK 5'CGCAGGAAGTGTTCACGTTNNSNNSNSNSNSAGTGAGATAAAGATTGTT3'

## PCR3

NCO-SP 5'CGG GCC ATG GCT ATT CAA CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT CCC TTT  
TTT GCG GCA TTT3'

Tail20 5'GGAATAGCCGTGGATCGTGG3'

N: mezcla equimolar de G,C,T,A y S mezcla equimolar de G y C.

Los templados usados para armar los genes permutados circularmente de la penicilino acilasa en esta estrategia se describen a continuación

PCR1	PCR2	PCR3
DNA plásmidico que contiene al gen silvestre de la penicilino acilasa.	Producto de primera estrategia purificado por gel de agarosa 1% por el kit de Qiagen.	Se utilizaron los productos de PCR1 y PCR2 previamente purificados por gel de agarosa 1% por el kit de Qiagen.

Condiciones para la PCR en una maquina Perkin Elmer, modelo Gene Amp PCR system 9700.

DNA 100 ng  
Buffer de PCR 1X 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl 8.3 (Perkin-Elmer)  
DNTP's 2.5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Perkin-Elmer)  
Oligo 5'-3' 20 pmol  
Oligo 3'-5' 20 pmol  
MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Perkin-Elmer)  
Taq polimerasa 2.5 U  
H<sub>2</sub>O bidestilada a acompletar 100 µL de reacción final

Programa en el termociclador para amplificar PCR1 y PCR3

No. ciclos	94 °C	50 °C	55 °C	72° C
1	5'	--	--	--
5	1.5'	1.5	--	2'
20	1'	--	2'	2'
1	--	--	--	10'

Programa en el termociclador para amplificar PCR2

No. ciclos	94 °C	55 °C	72° C
1	5'	--	--
20	1'	2'	2'
1	--	--	10'

Todos los productos de PCR's se purificaron en gel de agarosa al 1.5% utilizando el kit de Qiagen con las condiciones ahí mencionadas. Alrededor de 5 µg del producto de PCR3 se digirió con las enzimas *Nco* I y *Xho* I por 12 h según las condiciones de Boehringer y se purificó el fragmento con el kit de producto de PCR de Boehringer. Alrededor de 10 µg del plásmido pT4

promotor *blac* se pusieron a digerir con las enzimas *Nco* I, *Xho* I y *Eco* RV por 12 h según las condiciones de Boehringer, posteriormente se purificó el fragmento en gel de agarosa al 1.5% con el kit de Qiagen.

Se realizó una reacción de ligación con aproximadamente 500 ng de vector y 1 µg del inserto en un volumen final de 40 µl con 1 µl de ligasa del fago T4 en el buffer adecuado según Boehringer por 12 h a 16 °C, posteriormente el DNA fue precipitado con butanol y centrifugado por 10 min a 15,000 rpm. La pastilla de DNA se secó en el Savant por 10 min y se resuspendió en 10 µL de H<sub>2</sub>O estéril, de los cuales 5 µL de utilizaron para electroporar 30 µL de células XL1-Blue electrocompetentes, posteriormente a la recuperación se sembró 1 µL en medio LB sólido con 25 µg/mL de km a 30 °C, el resto se recuperó en 10 mL de medio LB sólido con 25 µg/mL de km y se crecieron a 30 °C por 12 h. Se purificó el plásmido proveniente del medio líquido por el kit de plásmido de Boehringer según el protocolo ahí descrito. Se verificó la concentración aproximada del plásmido y 100 ng del banco de plásmido se electroporó a 30 µL de la cepa de selección PACYCPKGS-9 XL1-Blue, posteriormente a la recuperación se sembraron en cajas con medio LB con 20 µg/mL de Cm, 25 µg/mL de km y P.G. en un intervalo de 60 a 250 µg/mL.

Cuarta estrategia: La estrategia general de amplificación de genes permutados se describe en la figura 16.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los diferentes fragmentos del gen de la penicilino acilasa son los siguientes:

PCR1

ACLINK 5'CGCAGGAAGTGTTCACGTTNNSNNSNSNSNSAGTGAGATAAAGATTGTT3'

ACTAPSPE 3' AGC CGT GGA TCG TGG ACT AGT TCA TTA TGC TGT TTG CGA 5'

PCR2

BMLU 5'GGT GTA CCG CAG GCC GCA3'

Tail-20 5'GGA ATA GCC GTG GAT CGT GG3'

N: mezcla equimolar de G,C,T,A y S mezcla equimolar de G y C.

Condiciones para las PCR's realizadas en una máquina Perkin-Elmer modelo gene Amp PCR system 9770.

DNA 100 ng

Buffer de PCR 1X 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl 8.3 (Perkin-Elmer)

DNTP's 2.5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Perkin-Elmer)

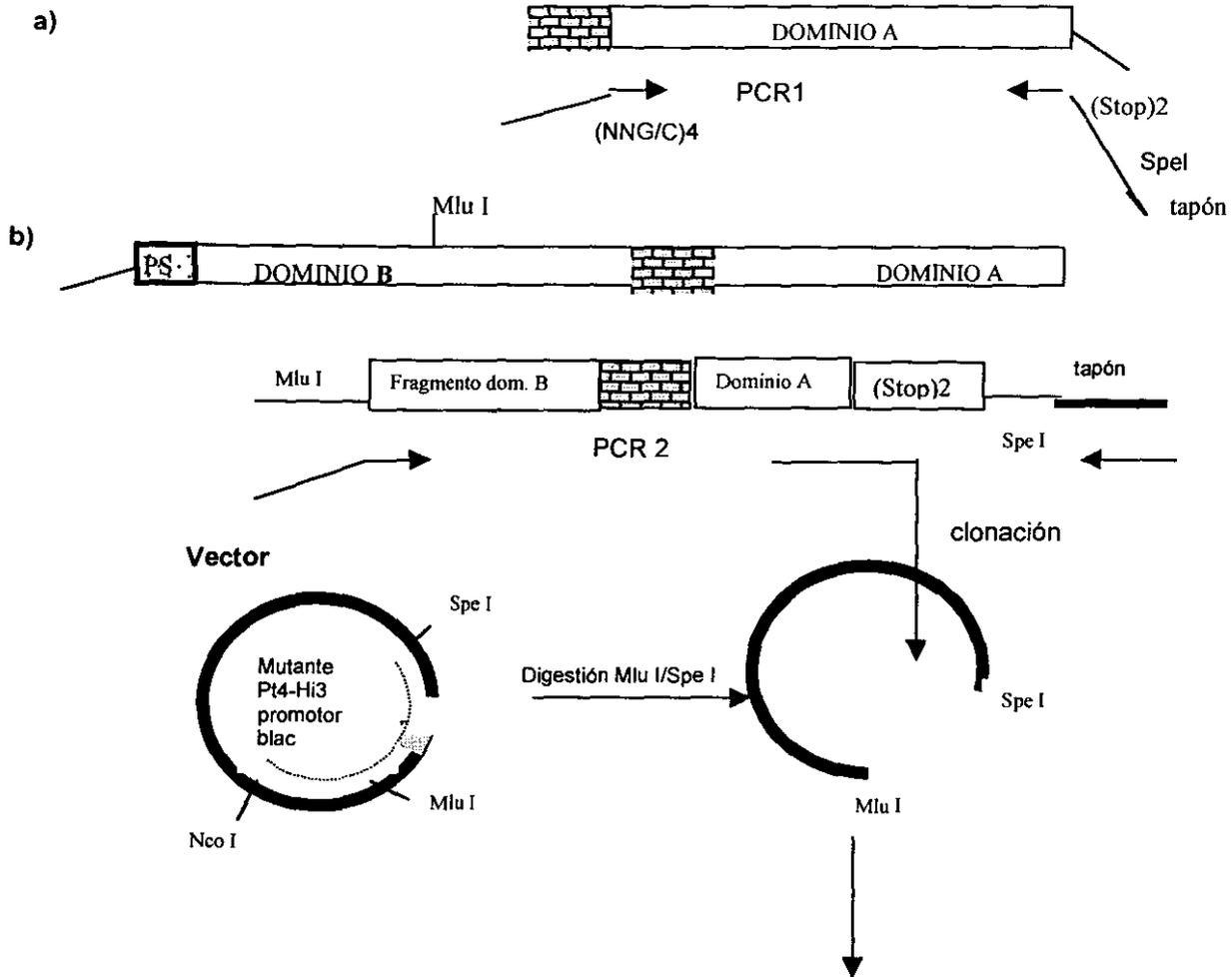
Oligo 5'-3' 20 pmol

Oligo 3'-5' 20 pmol

MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Perkin-Elmer)

Taq polimerasa 2.5U

H<sub>2</sub>O bidestilada a completar 100 µL de reacción final



Una vez clonados los genes, se siguieron los pasos de la primera estrategia a partir de la transformación en la cepa XL1-Blue

**Figura 16.** Cuarta estrategia para obtener los genes permutados de la penicilino acilasa, a) se amplificó el dominio A con la variabilidad en el conector, b) Para amplificar el fragmento a clonar (PCR2) se utilizó como templado un gen permutado circularmente y el producto de PCR1.

**Templados utilizados en las diferentes PCR's**

PCR1	PCR2
Producto de PCR3 de la primera estrategia, previamente purificado.	DNA plásmidico que contiene al gen de la permutación circular L1 y producto de PCR1, previamente purificados en gel de agarosa 1.5%

## Programa en el termociclador para amplificar PCR1 y PCR2

No. ciclos	94 °C	50 °C	55 °C	72° C
1	4'	—	—	—
5	1.5'	1.5'	—	2'
20	1.5'	—	2'	2'
1	—	—	—	10'

Todos los productos de PCR's se purificaron en gel de agarosa al 1.5% utilizando el kit de Qiagen con las condiciones ahí mencionadas. Alrededor de 5 µg del producto de PCR2 se digirió con las enzimas *Nco* I y *Xho* I por 12 h según las condiciones de Böehringer y se purificó el fragmento con el kit de producto de PCR de Böehringer.

Alrededor de 10 µg del plásmido pT4–permutación circular Blink1 promotor *blac* se digirieron con las enzimas *Mlu* I y *Spe* I por 12 h según las condiciones de Boehringer, posteriormente se purificó el fragmento en gel de agarosa al 1.5% con el kit de Qiagen en una electroforesis con buffer TBE 1X a 100V.

Se realizó una reacción de ligación con aproximadamente 3 µg de vector y 3 µg del inserto en un volumen final de 20 µl con ligasa del fago T4 en el buffer adecuado según Boehringer por 12 h a 16 °C, posteriormente el DNA fue precipitado con butanol y centrifugado por 10 min a 15,000 rpm. La pastilla de DNA se secó en el Savant por 10 min y se resuspendió en 10 µL de H<sub>2</sub>O estéril, de los cuales 3 µL se utilizaron para electroporar 5 µL de células XL1-Blue electrocompetentes, después de la recuperación se sembró 1 µL en medio LB sólido con 25 µg/mL de Km a 30 °C, el resto se recuperó en 10 mL de medio LB sólido con 25 µg/mL de Km y se crecieron a 30 °C por 12 h. Se purificó el plásmido proveniente del medio líquido por el kit de plásmido de Boehringer según el protocolo ahí descrito. Aproximadamente 100 ng del banco de plásmido se electroporó en 30 µL de la cepa de selección PACYCPKGS-9 XL1-Blue después de la recuperación se sembraron en cajas con medio LB con 20 µg/mL de Cm, 25 µg/mL de km y P.G. en un intervalo de 60 a 250 µg/mL.

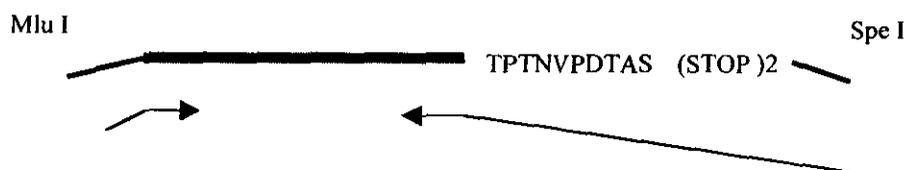
### Caracterización de las mutantes

#### Ensayos de MIC's

A un inculo de la variante de interés en 3 mL de medio LB crecido por 12 h, se ajustaron las O.D. a la misma concentración a 600 nm con medio LB y se siguió el procedimiento antes descrito.

#### Adición de una etiqueta de 10 aminoácidos en algunas mutantes y enzima silvestre

A los genes de la enzima silvestre y de algunas mutantes permutadas circularmente se les adicionó una etiqueta de 10 aminoácidos para poder ser inmunodetectadas con anticuerpos monoclonales.



Oligos utilizados para introducir la bandera de 10 aminoácidos

BMLU híbrida 5' GGT GTA CCG CAG GCC GCA 3'

ACTAPSPEAA Híbrida con 12 pb del dominio A e introduce un sitio Spe I, una parte del oligo tapón y una bandera de 10 aa

5' AGC CGT GGA TCG TGG ACT AGT TCA TTA AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC GTA CGG GTA TGC TGT TTG CGA3'

Condiciones para la PCR en una máquina Perkin-Elmer modelo Gene Amp PCR System 9770.

DNA 200 ng

Buffer de PCR 1X 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl 8.3 (Perkin-Elmer)

DNTP's 2.5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP (perkin-elmer)

Oligo 5'-3' 20 pmol

Oligo 3'-5' 20 pmol

MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (perkin-elmer)

Taq polimerasa 2.5U

H<sub>2</sub>O bidestilada a completar 100 µL de reacción final

Programa en el termociclador para amplificar PCR

No. ciclos	94 °C	50 °C	55 °C	72° C
1	4'	--	--	--
5	1.5'	1.5'	--	2'
20	1.5'	--	2'	2'
1	--	--	--	10'

Todos los productos de PCR's se purificaron en gel de agarosa al 1.0 % utilizando el kit de Qiagen con las condiciones ahí mencionadas. Alrededor de 5 µg del producto de PCR se digirió con las enzimas Mlu I y Spe I por 12 h según las condiciones de Boehringer y se purificó el fragmento.

Se realizó una reacción de ligación con aproximadamente 100 ng de vector y 100 ng del inserto en un volumen final de 20 µl con 1 µL de ligasa del fago T4 en el buffer adecuado según Boehringer por 12 h a 16 °C, posteriormente el DNA fue precipitado con butanol y centrifugado por 10 min a 15,000 rpm. La pastilla de DNA se secó en el Savant por 10 min y se resuspendió en 10 µL de H<sub>2</sub>O estéril, de los cuales 3 µL se utilizaron para electroporar 5 µl de células XL1-Blue electrocompetentes, después de la recuperación se sembraron en medio LB sólido con Km 25 µg/mL a 30 °C por 12 h. Se purificó el plásmido proveniente de 3 colonias por el kit de plásmido de Boehringer según el protocolo ahí descrito. Se verificó la concentración aproximada del plásmido. Posteriormente se hicieron ensayos de MIC como se menciona anteriormente.

### **Inmunodetección de penicilino acilasa**

Un gel de SDS-PAGE se transfirió a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 60 V en buffer de transferencia (TRIS 50 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.037% y metanol 20% pH 8.3), se lavó la nitrocelulosa con PBS 1X y se bloqueó con BSA 3% durante una hora en agitación. Posteriormente se lavó la nitrocelulosa con PBS 1X y se inmunodetectó con el primer anticuerpo (antitag10aa-12CA) a una dilución 1:500 en BSA 1% por una hora. Se lavó la nitrocelulosa con PBS 1X y se acopló el segundo anticuerpo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina 1:1000 en BSA 1% durante una hora. Se lavó la nitrocelulosa con PBS 1X y se reveló con 1.5 mL de solución para fosfatasa alcalina (BCIP/NBT premixed ZYMED) se detuvo la reacción a los dos minutos con 50 mL de EDTA 0.005M y se lavó con agua miliQ en exceso y secó la nitrocelulosa.

### **Expresión de la proteína bajo promotor *blac***

Un preinóculo de 3 mL crecido por 12 h de la variante de interés, se usó para inocular un volumen de 10 mL por 12 h en medio LB líquido con 25 µg/mL de km, en el caso de muestras en serie se ajustaron las O.D. a la misma concentración a 600 nm con medio LB, la masa celular se recuperó por centrifugación a 4000 rpm por 15 min y se resuspendió en 500 µL de PBS 1X. Las muestras se mantuvieron en hielo y se sonicaron tres veces por periodos de 15 pulsos con intervalos de 20 segundos en un equipo SONIFER 450, posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm a 4°C por 3 min y se recolectó el sobrenadante, 10 µL de cada muestra se mezclaron con 10 µL de buffer de carga para proteínas, se calentaron por 5 min a 95 °C y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% el gel se corrió en una electroforesis a 60 V para el gel de empacamiento y posteriormente a 100V con buffer de TRIS-Glicina (0.3% TRIS, SDS 0.1% y Glicina 1.44%).

### **Actividades enzimáticas de extractos proteicos**

#### **Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford**

El extracto de proteínas se ajustó en un volumen final de 0.8 mL en H<sub>2</sub>O, se le agregaron 0.2 mL de reactivo de Bradford (Biorad) se dejaron reaccionar por 5 min y se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650. Para determinar la concentración de proteínas se interpoló en una curva patrón de albúmina bovina en un intervalo de 0 a 20 µg/ mL.

**Método de paradimetilaminobenzaldehído (PDAB) para la determinación de 6-APA.**

Este método se basa en la formación de una base de Schiff entre el PDAB y el 6-APA que produce una coloración amarilla que puede ser detectada espectrofotométricamente.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100  $\mu$ L en buffer de fosfatos pH 7.8.

La cantidad de proteína se ajustó en 90  $\mu$ L de buffer de fosfatos y se incubó por 5 minutos a 37°C, posteriormente se agregaron 10  $\mu$ L de Penicilina G (SIGMA) 20% y se dejó desarrollar la reacción a 37 °C por 10 min. Se detuvo la reacción con 2.5 mL de etanol absoluto y se reveló con 1.25 mL de PDAB por 15 minutos, en el caso donde se presentó un precipitado blanco, la muestra se centrifugó a 3000 rpm/2 min y finalmente se leyó a 412 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650. Se calculó la concentración de 6-APA (SIGMA) por interpolación en la curva de calibración. La curva de calibración se preparó realizando 5 diluciones 1:1 de una solución patrón que contiene 2.5 mg/mL de 6-APA en buffer de fosfatos 0.1 M pH7.8 de las cuales se toman 0.1 mL para realizar la determinación de 6-APA.

La preparación del reactivo paradimetilaminobenzaldehído (SIGMA) fue de la siguiente manera: solución de PDAB al 1% (p/v), alcohol etílico al 60% y ácido sulfúrico concentrado 0.5% (v/v).

**Clonación en el vector pET bajo promotor del fago T7**

Al gen de la enzima silvestre y de tres mutantes permutadas circularmente se les adicionó una etiqueta de seis histidinas con el fin de poder purificarlas por medio de una columna empacada con resina de Níquel. Los oligos utilizados para las anteriores construcciones son los siguientes:

Gen silvestre

Ncopac 5' GGC CCA TGG AAA ATA GAA ATC GTA TGA TCG TG 3'

Gen permutado circularmente

Ncosp 5' CGG GCC ATG GCT ATT CAA CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT CCC TTT  
TTT GCG GCA TTT 3'

TAQHIS

5' TCG TGG ACT AGT TCA TTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG AGA AGC GTA GTC CGG 3'

**Condiciones de PCR para amplificar el gen de la penicilina acilasa permutada circularmente**

DNA 200 ng

Buffer de PCR 1X 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl 8.3 (Perkin-Elmer)

DNTP's 2.5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Perkin-Elmer)

Oligo 5'-3' 20 pmol

Oligo 3'-5' 20 pmol

MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Perkin-Elmer)

Taq polimerasa 2.5 U

H<sub>2</sub>O bidestilada a completar 100  $\mu$ L de reacción final



### **Expresión de la enzima silvestre**

Con un preinóculo de 10 mL de la cepa XL1-Blue previamente transformada con la construcción que contenía a la enzima silvestre bajo el promotor *trc* y la etiqueta de His, se inoculó un matraz que contenía un litro de medio líquido LB, se dejó crecer a 28 °C y 300 rpm por 12 h.

### **Purificación de las proteínas mutantes y silvestre en condiciones nativas**

Una vez sobreexpresada la proteína, el cultivo se centrifugó en una centrifuga Eppendorf 5804R a 10000 rpm por 3 min a 4 °C y se resuspendió en 20 mL de PBS 1X. Las muestras se mantuvieron en hielo y se sonicaron cinco veces por periodos de 30 segundos con intervalos de 20 segundos en un equipo SONIFER 450, posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C por 15 min y se recolectó el sobrenadante. Al extracto de proteínas se le agregaron 400 µL de agarosa con níquel al 50% (NTA de Qiagen), se agitaron cuidadosamente a 4 °C por 2h. Una vez montada la columna con la resina se realizaron lavados con 250 mL de PBS 1X pH 8 20 mM de imidazol, finalmente se llevó a cabo la elución con 5 mL de PBS 1X pH 8.0 250 mM de imidazol. Para la proteína L2, los lavados se hicieron con 250 mL de PBS 0.5X pH 8 15 mM de imidazol. Una vez obtenida la proteína purificada, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% a 15 mA en buffer de TRIS- Glicina (TRIS-base 0.3%, SDS 0.1%, glicina 1.4%) en una cámara de marca Hoefer Scientific (HIS) modelo SE280. Una vez terminada la electroforesis el gel se tiñó en una solución al 5% de ac. acético glacial, 0.1% de azul de Comassie y 10% de etanol industrial por 30 min en agitación, posteriormente se destiño con H<sub>2</sub>O destilada mediante 10 pulsos en el microondas de 30 seg.

### **Obtención de los parámetros cinéticos de penicilino acilasa silvestre y permutación circular.**

Se midieron velocidades iniciales a diferentes concentraciones de P.G. (10 a 100 mM) utilizando una concentración constante de proteína para cada caso, está concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford y por titulación del sitio activo. El tiempo final de reacción fue de 10 min a 37 °C, para determinar el 6-APA formado se utilizó el método de PDAB. Se hicieron curvas de velocidades iniciales para obtener la  $K_m$  y  $V_{max}$ .

### **Titulación de sitios activos de las penicilino acilasas por fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF).**

Fueron determinados directamente usando diferentes concentraciones de PMSF (GIBCO BRL ) hasta la alcanzar la inhibición total. La enzima fue incubada a 37° C por 20 min en un volumen

final de 100  $\mu$ L en buffer de fosfatos pH 7.8 en concentraciones de PMSF de 0 a 200 nM. La actividad residual fue determinada por el método de PDAB con penicilina G a 10 mM. El PMSF se preparó momentos antes de usar, se disolvió en acetonitrilo y se protegió de la luz visible con papel aluminio.

### **Evolución dirigida por gene shuffling de la permutación circular L1**

Este método se realiza en varias etapas consecutivas.

1.- Amplificación del gen con los oligos que se utilizaron para clonar el gen en el vector pT4. El producto de PCR se purificó de los oligos sobrantes y de cualquier otro producto inespecífico utilizando electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1.5%. La banda de DNA se visualizó con una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda larga y se cortó del gel con una navaja. La agarosa se solubilizó y purificó por el kit de Qiagen por el protocolo estándar.

2.- Degradación controlada de DNA de doble cadena con DNAsa .

Tres reacciones de 10  $\mu$ g del producto puro de PCR se pusieron en presencia de 0.1 U de DNAsa (Boehringer) en un buffer con 50 mM de TRIS HCl pH 7.4, 1 mM de  $MgCl_2$  y la reacción se llevó a cabo por 15 min a 37 °C .

La reacción se detuvo con 10  $\mu$ L de la mezcla de terminado (stopmix: azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, EDTA 50 mM pH 8). Los fragmentos de DNA entre 100 y 300 pb se purificaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando el Kit de Qiagen. Se cuantificó la concentración de fragmentos de DNA por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

3.- Etapa de PCR "sin oligos".- Alrededor de 2  $\mu$ g se sometieron a una reacción de PCR convencional pero que careció de oligos.

Programa en el termociclador

No. ciclos	94 °C	50 °C	72° C
1	3'	--	--
50	1'	1'	2'
1	--	--	10'

4.- Etapa de PCR "con oligos".- En reacciones separadas, 1  $\mu$ L de las reacciones de PCR del paso anterior se sometieron a una nueva PCR específica en presencia de los oligos.

Condiciones para la PCR realizada en una máquina Perkin-Elmer modelo Gene Amp PCR system 9700.

DNA 100 ng

Buffer de PCR 1X 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl 8.3 (Perkin-Elmer)

DNTP's 2.5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Perkin-Elmer)

Oligo 5'-3' 20 pmol

Oligo 3'-5' 20 pmol

MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Perkin-Elmer)

Taq polimerasa 2.5 U

H<sub>2</sub>O bidestilada a completar 100 µL de reacción final

**Programa en el termociclador para amplificar el dominio B y dominio A**

No. ciclos	94 °C	55 °C	72° C
1	1'	—	—
5	1'	1'	2'
20	1'	1'	2'
1	—	—	10'

Todos los productos de PCR's se purificaron en gel de agarosa al 2% utilizando el kit de Qiagen con las condiciones ahí mencionadas. Alrededor de 5 µg del producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *Nco* I y *Xho* I por 12 h según las condiciones de Boehringer y se purificó el fragmento adecuado.

### Preparación del vector pT4 –permutación circular Blink1 con el promotor *blac*

Debido a que se clonaron por separado los dominios A y B mutagenizados, fue necesario hacer dos tipos de vector a partir del plásmido pT4 permutación circular Blink1.

Alrededor de 5 µg de plásmido se digirieron con las enzimas *Mlu* I y *Spe* I por 12 h y otros 5 µg de plásmido se digirieron con las enzimas de restricción *Nco* I y *Mlu* I por 12 h según las condiciones de Boehringer, posteriormente se purificó el fragmento en gel de agarosa al 1.5% con el kit de Qiagen. Se realizó una reacción de ligación con aproximadamente 3 µg de vector y 3 µg del inserto en un volumen final de 20 µl con 1 µL de ligasa del fago T4 en el buffer adecuado según Boehringer por 12 h a 16 °C, posteriormente el DNA fue precipitado con butanol y centrifugado por 10 min a 15,000 rpm. La pastilla de DNA se secó en el Savant por 10 min y se resuspendió en 10 µL de H<sub>2</sub>O estéril, de los cuales 3 µL se utilizaron para electroporar 5 µl de células XL1-Blue electrocompetentes, después de la recuperación se sembró 1 µL en medio LB sólido con 25 µg/mL de km a 30 °C, el resto se recuperó en 10 mL de medio LB sólido con 25 µg/mL de km y se crecieron a 30 °C por 12 h. Se purificó el plásmido proveniente del medio líquido por el kit de plásmido de Boehringer y se verificó la concentración aproximada del plásmido. Aproximadamente 100 ng del plásmido del banco se electroporaron en 30 µL de la cepa de selección PACYCPKGS-9 XL1-Blue después de la recuperación se sembraron en cajas con medio LB con 20 µg/mL de Cm, 25 µg/mL de km y P.G. en un intervalo de 60 a 250 µg/mL.

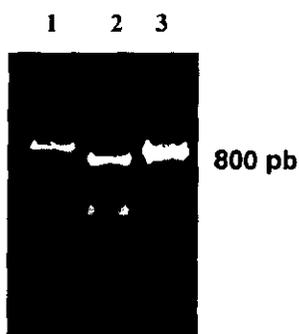
## RESULTADOS

Para la identificación de las proteínas activas permutadas circularmente, era necesario contar con una cepa de selección para actividad de penicilino acilasa.

Se escogieron dos cepas de *E. coli* a las cuales se les confirió resistencia a 6-APA por medio de una  $\beta$ -lactamasa, previamente modificada para tener una mayor especificidad por 6-APA y menor por penicilina G (Osuna et al, 1995).

### Caracterización de la $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA

Se adicionaron los sitios de restricción BamH I y Sal I al gen que codifica para está  $\beta$ -lactamasa (figura 18) posteriormente se clonaron bajo dos diferentes promotores en el plásmido pACYC Cm<sup>r</sup>.



**Figura 18.** Amplificación del gen de la  $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA con los sitios de restricción BamH I y Sal I por medio de PCR. Carril1:  $\beta$ -lactamasa bajo promotor *blac*, carril2: PCR control de la  $\beta$ -lactamasa y carril 3:  $\beta$ -lactamasa con promotor *trc*.

El gen se expresó con el promotor *b/a* (nativo) y con el promotor *trc* de mayor fuerza transcripcional que el de tipo natural. Estas clonaciones se introdujeron a la cepa XL1-Blue y se sembraron en cajas con medio LB con diferentes dosis de 6-APA. Se seleccionaron diez colonias de cada construcción que crecieron a una dosis de 100  $\mu$ g/mL de 6-APA y se hicieron ensayos de MIC (concentración mínima inhibitoria) en penicilina G y 6-APA de cada una de ellas. De las colonias obtenidas en esta fase se seleccionaron cuatro que presentaban una sensibilidad a una concentración de 60  $\mu$ g/mL de penicilina G, estas se crecieron y se purificó su plásmido. Para comprobar que el MIC's era debido a los genes de las construcciones, se retransformaron a la cepa de selección. Sólo bajo el promotor *blac* se obtuvo sensibilidad a penicilina G a una dosis de 60  $\mu$ g/mL y resistencia a una concentración de 240  $\mu$ g/mL de 6-APA. Se seleccionó una colonia denominada PACYCPKGS-9 y con ella se montó el sistema de selección positiva para actividad de penicilino acilasa.

Con respecto a los ensayos bajo promotor *trc*, el MIC de la cepa en penicilina G se incremento a 100 µg/mL, lo que representa un ruido de fondo demaciado alto para poder ser utilizado en selección.

### Construcción de las cepas de selección

Debido a que la maduración de la penicilino acilasa puede depender de la cepa de expresión decidimos evaluar el sistema de selección con las cepas de *E. coli* JM101 y XL1-Blue.

Con el plásmido que contenía la construcción de la β-lactamasa específica para 6-APA se transformaron las dos cepas, posteriormente se hicieron ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC) sobre los antibióticos penicilina G y 6-APA a 28°C y 37°C, obteniéndose los resultados de la tabla 2. Por otro lado, un grupo de Taiwan logró obtener una cepa de selección en *E. coli* (HB101PAC) para actividad de penicilino acilasa mediante mutagénesis química, está cepa tiene la característica, al igual que la propuesta en este trabajo, de ser sensible a P.G. y resistente a 6-APA (Chou C.P. et al, 1999-a), sus valores de ensayos de MIC's se muestran en la tabla 2 para su comparación.

**Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas de selección para actividad de penicilino acilasa a 28 y 37 °C**

	Penicilina G µg/mL	6-APA µg/mL
<i>E. coli</i> XL1-Blue	25	20
<i>E. coli</i> JM101	20	15
<i>E. coli</i> XL1-Blue PACYCPKGS-9	60	250
<i>E. coli</i> JM101 PACYCPKGS-9	60	200
<i>E. coli</i> HB101pac	10	140

En las tres cepas crecidas tanto a 28 y 37 °C no se observaron variaciones en los valores de MIC en penicilina G y 6-APA. Se observó que en las cepas *E. coli* XL1-Blue PACYCPKGS-9 y *E. coli* JM101 PACYCPKGS-9 los valores de resistencia a P.G. son relativamente elevados y esto repercute directamente en la selección de mutantes, ya que mutantes con actividades pequeñas no podrían ser identificadas por crecer dentro del intervalo de ruido de fondo.

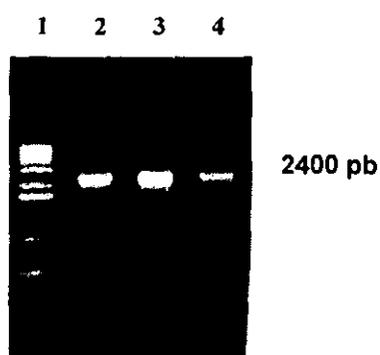
La cepa HB101pac presentó una resistencia a P.G. menor que las otras cepas, esto hace que el ruido de fondo sea menor al momento de rastrear mutantes con actividad de penicilino acilasa.

Las cepas *E. coli* XL1-Blue PACYCPKGS-9 y *E. coli* JM101 PACYCPKGS-9 se someten a cuatro antibióticos cuando se utilizan como sistema de selección. El plásmido que codifica para la β-lactamasa específica para 6-APA contiene resistencia a cloramfenicol, la penicilina G que

es el sustrato de la penicilino acilasa, el 6-APA formado de la hidrólisis de la penicilina G y el marcador que se introduce en los bancos de mutantes de penicilino acilasa, en cambio la cepa HB101PAC se somete solo a tres ya que no utiliza ningún plásmido para tener resistencia a 6-APA, lo que representa una carga metabólica menor.

### Sistema de selección vs penicilino acilasa silvestre

Para definir mejor las características de las cepas de selección, el gen de la penicilino acilasa silvestre se clonó bajo dos promotores, un promotor de expresión transcripcional débil *blac* y un promotor de intermedia fuerza transcripcional *trc*. Previamente, se amplificó el gen por PCR (figura 19), debido a que el gen tiene un sitio interno *Nco* I se realizó una digestión parcial y se purificó el fragmento de interés (2400 pb), para su posterior clonación en los dos vectores.



**Figura 19.** Amplificación del gen de la penicilino acilasa silvestre por medio de PCR (2400 pb). Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb plus, carril 2: PCR de penicilino acilasa silvestre, carril 3: PCR purificada y carril 4: PCR purificada y digerida parcialmente *Nco* I y totalmente *Xho* I.

Una vez clonados los genes, se transformaron en XL1-Blue y se comprobaron por patrones de digestión y secuencia la integridad del gen y del promotor en ambos vectores. Posteriormente las diferentes cepas de selección se transformaron con estas construcciones y se hicieron ensayos de MIC a 28 y 37 °C.

En la tabla 3 se resumen las características de las cepas de selección, en donde se confirma que el sistema de selección es funcional en las dos cepas desarrolladas en este trabajo.

Los ensayos de la enzima silvestre con diferentes promotores mostraron diferencias entre los valores de MIC. Como se esperaba, en el de mediana fuerza transcripcional (*trc*) se produce una mayor cantidad de proteína, lo que permite que las cepas sobrevivan a concentraciones más altas de penicilina G que las cepas en donde la penicilino acilasa silvestre esta bajo un promotor de menor fuerza transcripcional (*blac*). Esto puede representar una ventaja, ya que bancos de mutantes en donde se rastreé la actividad de penicilino acilasa se pueden clonar

bajo promotor *trc* y someter a selección, para rescatar algunas mutantes con actividades pequeñas que no se podrían identificar bajo el promotor débil por caer en el ruido de fondo de la cepa.

**Tabla 3. Concentraciones mínimas inhibitorias detectadas en las diferentes cepas de selección transformadas con la penicilino acilasa silvestre y crecidas a 28 °C.**

Cepa de selección	MIC con ruido de fondo	MIC real
	Penicilina G $\mu\text{g/mL}$	Penicilina G $\mu\text{g/mL}$
<i>E. coli</i> XL1-Blue PACYCPKGS-9 PAC <i>trc</i>	120	60
<i>E. coli</i> XL1-Blue PACYCPKGS-9 PAC <i>blac</i>	95	35
<i>E. coli</i> JM101 PACYCPKGS-9 PAC <i>trc</i>	100	40
<i>E. coli</i> JM101 PACYCPKGS-9 PAC <i>blac</i>	85	25
<i>E. coli</i> HB101PAC PAC <i>trc</i>	60	50
<i>E. coli</i> HB101PAC PAC <i>blac</i>	45	35

El gen de la penicilino acilasa con los dos promotores estudiados dan un nivel de resistencia mayor a penicilina G en la cepa XL1-Blue que en la JM101, lo cual sugiere que esta cepa produce mayores niveles de proteína en forma activa.

Con respecto a la cepa HB101PAC los valores de MIC en penicilina G son más bajos que los obtenidos en las cepas *E. coli* XL1-Blue PACYCPKGS-9 y *E. coli* JM101 PACYCPKGS-9, sin embargo hay que considerar que el valor de ruido de fondo de esta cepa es menor que en las otras cepas. Para comparar los datos reales de selección de las diferentes cepas, se restó el MIC de P.G. de las diferentes cepas de selección a los valores de MIC obtenidos con la enzima silvestre (MIC real).

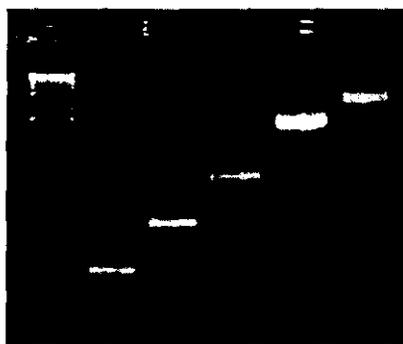
#### **Construcción de las variantes permutadas de la penicilino acilasa**

Para realizar la construcción de las variantes permutadas se siguieron cuatro estrategias debido a que los bancos no alcanzaban los tamaños adecuados para representar toda la variabilidad generada por medio de PCR en el diseño propuesto.

### Primera estrategia

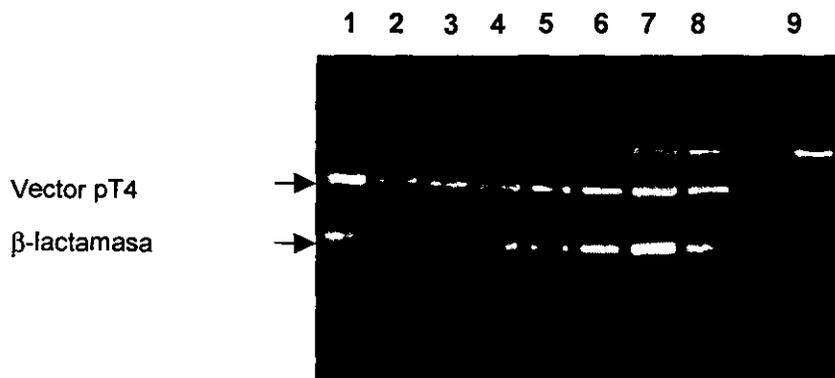
El gen de la penicilino acilasa tiene un sitio de restricción Nco I que corresponde a las posiciones 419 a 423 de del gen. Este sitio de restricción se eliminó por medio de oligonucleótidos dirigidos al sitio, sin afectar la estructura primaria de la proteína (figura 13). Diversos fragmentos de PCR se fueron extendiendo por medio de PCR para obtener la construcción final de los genes que codifican para las variantes monoméricas (figura 20). Posteriormente esta biblioteca fue clonada en el vector pT4 bajo el promotor *trc* previamente preparado. Se realizaron ensayos de ligación variando la relación inserto:vector debido a que no se lograba alcanzar el tamaño adecuado.

1 2 3 4 5 6



**Figura 20.** Ensamblado del gen para la biblioteca de las variantes monoméricas de la penicilino acilasa. Carril1:marcador de peso molecular 1Kbplus, carril2:fragmento correspondiente a la PCR1 (220 pb), carril 3:fragmento correspondiente a la PCR2 (400 pb), carril 4: amplificación del producto de PCR correspondiente al dominio A (780 pb), carril 5: amplificación del dominio B mutagenizado con la introducción de un conector de cuatro aminoácidos (1700 pb) y carril 6: amplificación del b de la permutación circular (2400 pb).

El mejor banco obtenido fue de alrededor de  $5 \times 10^5$  variantes, pero al analizar el tamaño real de esta biblioteca por patrones de digestión y PCR de DNA de 20 colonias, solo una cumplió los requisitos de permutación circular (figura 21). Para analizar si estaba presente al menos el dominio A del gene se realizó la PCR correspondiente. El fragmento adecuado se amplificó en dos de cuatro variantes, lo cual indicaba la presencia del gen, pero al tratar de amplificar el gen completo solo la variante denominada pt4h-1 amplificó producto de PCR del tamaño adecuado (datos no mostrados). Estas mismas clonas fueron analizadas por patrones de digestión para buscar el inserto. La misma clona pt4h-1 fue la única que cumplió con el patrón de digestión esperado como se observa en la figura 21. Al secuenciar la clona denominada Pt4h-1, se verificó la integridad del gen y la secuencia del conector. La secuencia del conector corresponde a Stop-P-P-T.



**Figura 21.** Patrones de digestión de siete variantes aisladas en una concentración de 60  $\mu\text{g/mL}$  de penicilina G . carril 1:control vector pT4 (2000 pb) y  $\beta$ -lactamasa (800 pb), carril 2:variante Pt4h1, carril 3: variante Pt4h2, carril 4:variante Pt4h3, carril 5: variante Pt4h4, carril 6: variante Pt4h5, carril 7:variante Pt4h6, carril 8: variante Pt4h7 y carril 9:control:plásmido sobre enrollado.

Todo el banco se retó en la cepa de selección XL1-Blue PACYCPKGS-9. La mayoría de las clonas crecieron en la concentración de ruido de fondo, es decir alrededor de 60  $\mu\text{g/mL}$  de penicilina G. Finalmente, para eliminar una posible contaminación del gen silvestre se utilizaron oligonucleótidos específicos y ninguna amplificó el fragmento esperado (datos no mostrados).

### Segunda estrategia

Para observar si existía un efecto de intoxicación de las células bacterianas por la proteína permutada circularmente, se clonaron los bancos en el vector pTHIO-C el cual tiene la característica de poder ser reprimido o inducido a nivel transcripcional. De existir este efecto, en el estado reprimido obtendríamos un mayor número de variantes respecto al estado inducido.

Una vez amplificada la biblioteca de los genes de la penicilino acilasa permutada circularmente se clonaron en el vector pTHIO-C.

El tamaño de la biblioteca en estado reprimido fue de 440,000 variantes, de las cuales se identificó por patrones de digestión y PCR que 6 de 10 contienen el inserto (datos no mostrados), por lo que el tamaño real de la biblioteca se estimó en 264,000 variantes, en el estado inducido el tamaño real fue de 144,000 variantes, alrededor de 54.54% menor respecto al del estado reprimido. Algunas de las variantes secuenciadas provenientes del estado reprimido tienen una tendencia a mostrar glicinas, como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 4. Secuencias obtenidas en la zona del conector de genes de variantes permutadas circularmente.**

Secuencia	Nombre
PTHIOC-3	G-G-S-G
PTHIOC-6	R-G-G-S
PTHIOC-7	A-G-T-G
PTHIOC-9	<sup>stop</sup> -R-N-P

Se intentó cambiar el gen que da resistencia a ampicilina por el de resistencia a kanamicina, pero en este plásmido el efecto de regulación se modificó.

### Tercera estrategia

El plásmido pT4 se utilizó con un promotor de fuerza transcripcional menor a *trc* llamado *blac*, se supuso que al disminuir la fuerza transcripcional y de esta forma la cantidad de la proteína dentro de la célula, no resultaría tóxico para la bacteria. Debido a que el ensamblaje del gen de las permutaciones circulares de la penicilino acilasa, se obtenía con muy bajos rendimientos y muchos subproductos, se modificó la estrategia. En esta nueva estrategia, el conector se ensambló en el lado del dominio A que es un fragmento más pequeño que el dominio B, de esta forma se beneficiaron los rendimientos de productos de PCR (figura 22).



**Figura 22.** Reconstrucción del gen de la penicilino acilasa permutada circularmente. Carril 1:amplificación por PCR del dominio A, carril 2:amplificación por medio de PCR de la permutación circular de la penicilino acilasa por la segunda estrategia y carril 3:amplificación del dominio B del gen de la penicilino acilasa.

Una vez clonada la biblioteca en el plásmido pT4 se transformó en la cepa XL1-Blue, donde se obtuvo una biblioteca de 90,000 variantes. Por patrones de digestión y PCR se confirmó que tres de cinco colonias tomadas al azar traen el inserto (figura 23), por lo que el tamaño real de la biblioteca se estimó en 37,800.



**Figura 23.** PCR para amplificar el gen de la penicilino acilasa de cinco variantes tomadas al azar de la segunda estrategia. Se observa que solo tres de cinco amplifican el fragmento esperado. Carril 1: control del tamaño esperado, carril 2: variante 1, carril 3: variante 2, carril 4: variante 3, carril 5: variante 4 y carril 6: variante 5.

Las variantes aisladas se secuenciaron y una de ellas presentó delección de una base, las otras variantes denominadas PT4pblac-2 y PT4pblac-5 tienen la secuencia en el conector de G-G-S-G y R-A-A-V respectivamente. La biblioteca se transformó a la cepa de selección *E. coli* PACYCPKGS-9 y se sembraron en penicilina G en un intervalo de 60 a 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , solo 8 colonias crecieron entre 70 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de penicilina G, a estas variantes y las obtenidas previamente en estrategia, se les realizaron ensayos de MIC y solo cuatro lograron crecer en 95  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de P.G. en una dilución 1:1000 en 48 h, entre las que se encuentran las variantes PT4pblac-2 y PT4pblac-5.

#### Cuarta estrategia

La aparición de genes truncados indicaba que el inserto tenía problemas para clonarse, posiblemente por su tamaño. Por lo que se decidió tratar de clonar un fragmento más pequeño. El gen de la penicilino acilasa tiene un sitio de restricción *Mlu* I antes de donde se introduce la zona del conector, este se aprovechó para dejar como parte del vector un fragmento de 1500 pb del gen permutado y de esta forma el fragmento clonado fue de 888 pb.

Se hicieron patrones de digestión de la mutante pT4pblac5 con las enzimas de restricción *Nco* I, *Mlu* I, *Spe* I y *Pvu* II para verificar los sitios únicos (datos no mostrados). Posteriormente para eliminar el fragmento de alrededor de 900 pb correspondiente a una fracción de la permutación circular, se digirió con las enzimas *Mlu* I y *Spe* I, este último sitio es parte del vector y se encuentra 30 pb después del sitio *Xho* I con el que previamente se clonó el gen, se digirió adicionalmente con la enzima *Pvu* II (presente dentro del fragmento *Mlu* I / *Spe* I) para obtener un vector con mejor calidad. Se hicieron nuevos juegos de oligonucleótidos específicos para la construcción del fragmento del gen permutado circularmente con la introducción del conector mutagenizado a saturación. Previamente se amplificaron, los dominos A y B y se reensamblaron con la zona mutagenizada a saturación como en las estrategias anteriores

(figura 24). Posteriormente se clonó el fragmento digerido con las enzimas *Mlu* I y *Spe* I en el vector previamente preparado. El tamaño de la biblioteca obtenida por esta estrategia fue de  $1.2 \times 10^6$  variantes, se obtuvieron tres fenotipos con respecto al tamaño de las colonias, los cuales se clasificaron como pequeño, mediano y grande. De las seis colonias tomadas al azar para verificar el tamaño real de la biblioteca, todas amplificaron el fragmento de PCR del tamaño adecuado, por lo que el tamaño real de la biblioteca se estimó en  $1.2 \times 10^6$  variantes.



**Figura 24.** Reensamblado de un fragmento del gen de la penicilino acilasa. Carril 1: Amplificación del gen permutado circularmente utilizado como control de peso molecular, carril 2: marcador de peso molecular 1500 pb, carril 3: amplificación por PCR del dominio A con el conector mutagenizado a saturación y carril 4: amplificación del fragmento a de 900 pb.

Todas las colonias que presentaron fenotipo grande y que se secuenciaron tienen un codón de paro en la zona del conector, a excepción de PT4BLINK-17 en donde el conector se recortó en un aminoácido y presentó únicamente glicinas (tabla 5). La secuencia en la zona del conector  $_{stop}$ -P-P-T se repitió cuatro veces, tal vez por una contaminación del templado original de donde se amplificaron los fragmentos del gen. Algunas secuencias presentaron deleciones en el conector y todas las mutantes con fenotipo clasificado como chico y mediano presentaron íntegra la secuencia de su conector (tabla 5). En todos los casos se observó una tendencia a presentar por lo menos una glicina en el conector.

**Tabla 5. Secuencias obtenidas en la zona del conector de genes de variantes permutadas circularmente.**

Secuencia	Nombre	fenotipo
PT4BLINK-1	N-E-G-M	chico
PT4BLINK-2	P-G-L-R	chico
PT4BLINK-3	G-G-E-A	chico
PT4BLINK-11	E-P-Q-R	mediano
PT4BLINK-13	G-G-L-K	mediano
PT4BLINK-15	D-P-A-G	mediano
PT4BLINK-17	G-G-G	grande
PT4BLINK-20	P-G-V-G	selección
PT4BLINK-21	Q-G-G-G	selección
PT4BLINKPG-4	G-D-A-L	selección
PT4BLINKPG-5	R-G-A-G	selección
PT4BLINK-5,8,14,18	<sup>stop</sup> -P-P-T	grande
PT4BLINK-10	L- <sup>stop</sup> -E-G	grande
PT4BLINK-12	<sup>stop</sup> -G-G-R	mediano

El banco se transformó en la cepa de selección *E. coli* XL1-Blue PACYCPKGS-9, se sembraron en dosis crecientes de penicilina G y se obtuvieron colonias en el intervalo de 60 a 200 µg/mL de penicilina G. En la caja de 200 µg/mL de P.G. en 48 h se obtuvieron 10 colonias de tamaño pequeño, se purificó el plásmido de cuatro de ellas. Para comprobar que el inserto estaba presente, se hicieron patrones de digestión y PCR (datos no mostrados), posteriormente se secuenciaron (tabla 5) y en todas se observó la aparición de glicinas, adicionalmente, se retransformaron a la cepa de selección para verificar los valores de MIC, los cuales se encontraron entre 85 y 100 µg/mL de P.G. en la dilución 1:1000 en 48 h / 37 ° C.

### Caracterización de las mutantes

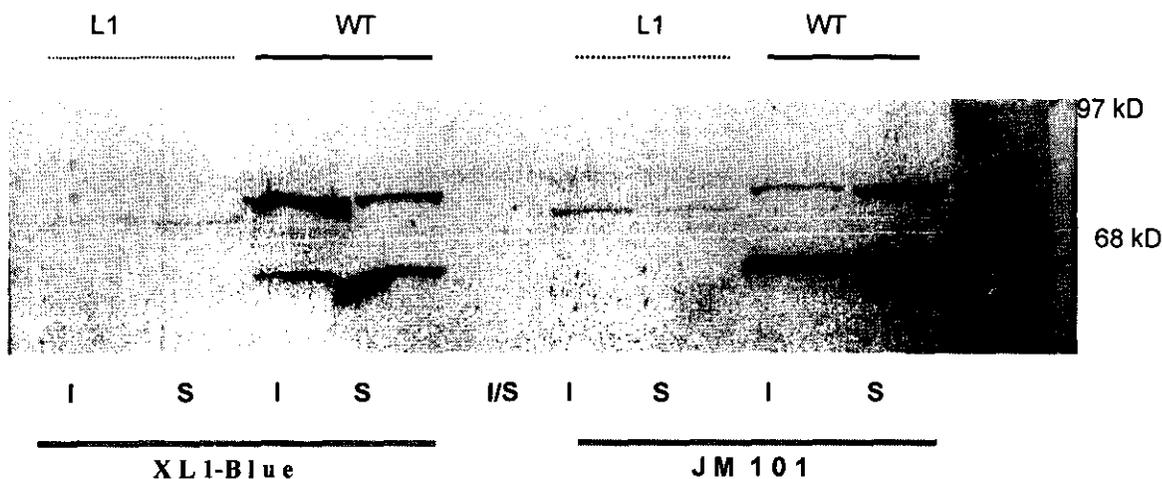
#### Ensayos de expresión de la enzima monomérica vs silvestre

Para confirmar si la expresión y maduración (en el caso de la silvestre) de la penicilino acilasa variaba en dos diferentes cepas de *E. coli* se hicieron ensayos de inmunodetección (figura 25). A la penicilino acilasa silvestre y a la mutante L1 previamente se les colocó una etiqueta de 10 aa en el carboxilo para la cual contamos con anticuerpos monoclonales, de esta forma, en la enzima silvestre solo es posible inmunodetectar la subunidad B. Para analizar cantidad de proteína inmunodetectada se utilizó un programa de análisis de imagen (NIH Image 1.61/68 K). El análisis se hizo comparando todas las bandas con la correspondiente al dominio B de la enzima WT producida en la cepa JM101.

**Tabla 6. Análisis densitométrico de la expresión de la enzima penicilino acilasa WT y monomérica**

	JM101		XL1-Blue	
	S	I	S	I
L1	33.77	35.52	34.92	31.99
WT Precursor	58.74	37.25	47.26	75.76
WT dominio B	100	84.53	61.39	40.26

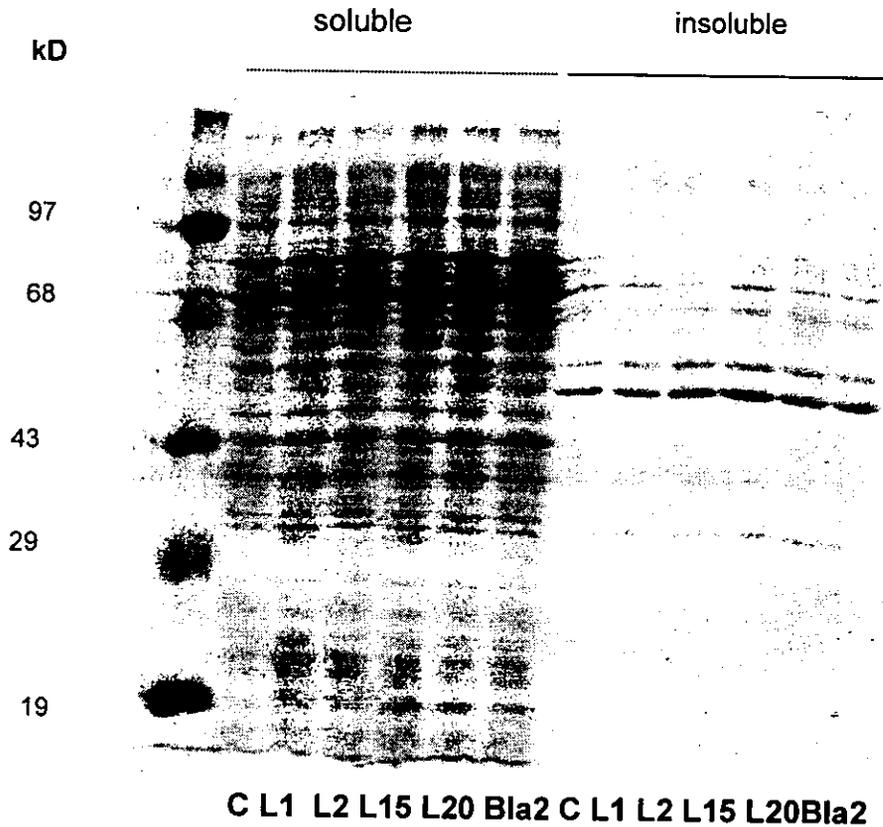
Se observó que la penicilino acilasa silvestre se expresa mejor en la cepa JM101 que en la XL1-Blue. En ambas cepas se observan dos bandas inmunodetectadas, la de mayor peso molecular corresponde al precursor inactivo y la banda de alrededor de 68 kD corresponde al dominio B. Por su parte, en la inmunodetección de la enzima monomérica L1 solo se observa una banda de alrededor de 86 kD, en ambas cepas los niveles de la enzima disminuyeron con respecto a la enzima silvestre.



**Figura 25. Inmunodetección con anticuerpos monoclonales en donde se observa la expresión de la penicilino acilasa silvestre y la mutante monomérica L1 en dos cepas de *E. coli*. De la columna 1 a 4, las proteínas se expresaron en la cepa XL1- Blue de la columna 6 a 9 en la cepa JM101, en la columna 5 como control de ambas cepas se tiene una mezcla de partes proporcionales de ambas cepas de las fracciones solubles e insolubles y en el carril 10 se tiene el marcador de peso molecular.**

**Expresión de las diferentes variantes de la penicilino acilasa monoméricas**

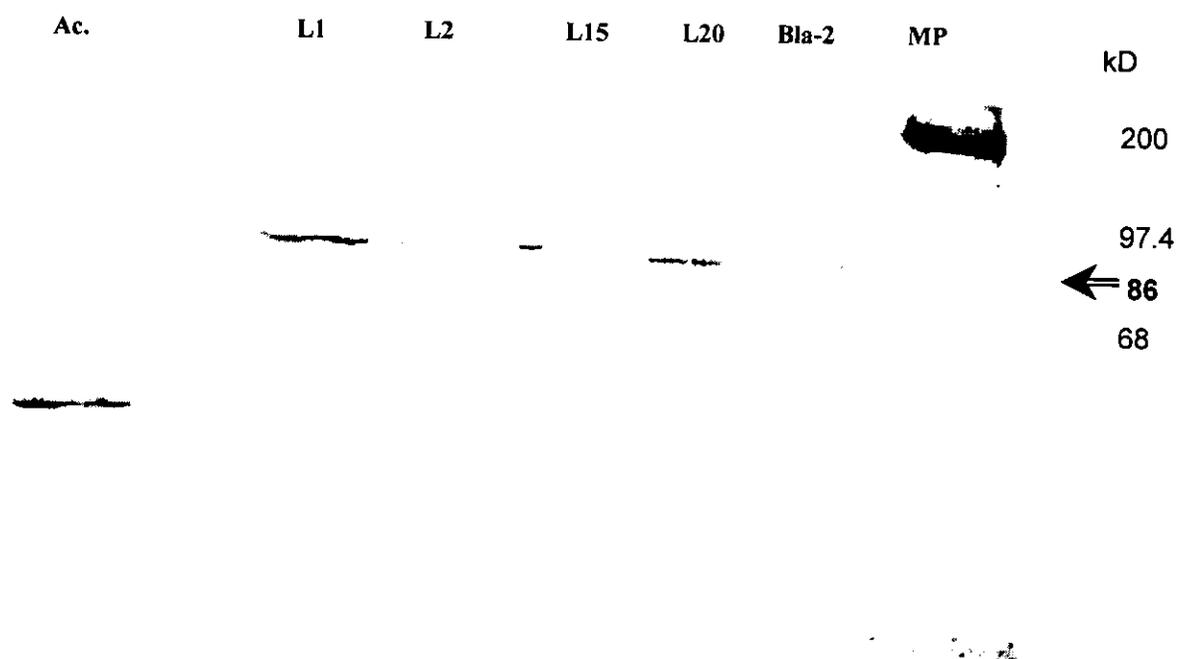
Análisis de geles de acrilamida SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie, indicaron bajos niveles de expresión para las variantes monoméricas de la penicilino acilasa como se observa en la figura 26.



**Figura 26.** Gel SDS-PAGE 12.5% teñido con azul de Coomassie, donde se muestran extractos totales de proteína de diferentes variantes monoméricas expresadas en la cepa XL1-Blue. C indica el control de proteínas totales de la cepa XL1-Blue.

### Inmunodetección de las enzimas monoméricas

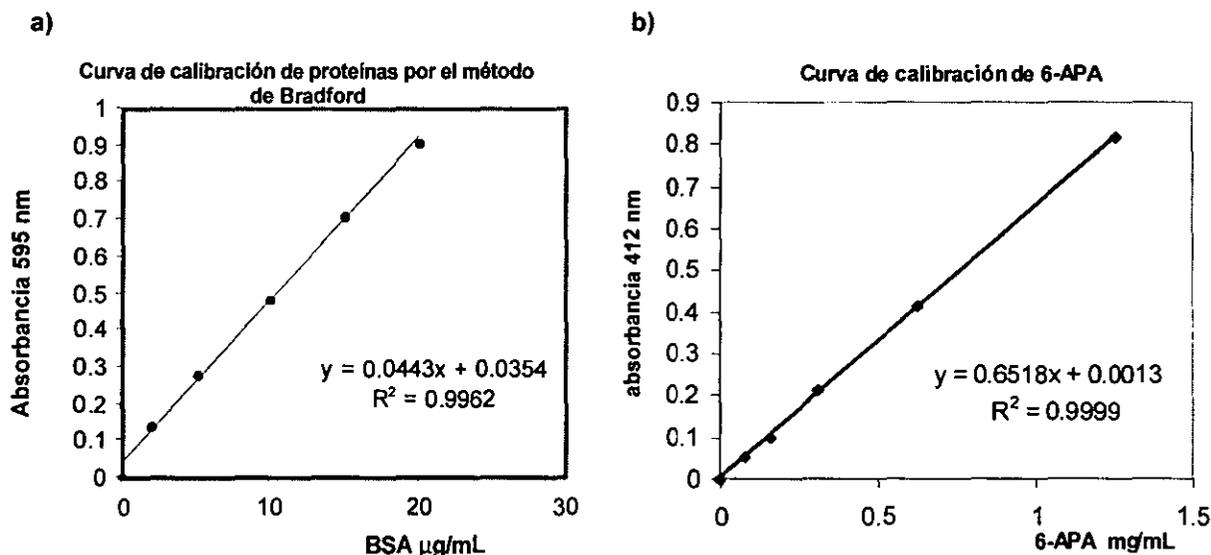
Debido a que no era posible identificar a las proteínas mutantes en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de coommasie, se hicieron ensayos de inmunodetección para determinar los niveles de producción en *E. coli* de las mutantes L1, L2, L3, L13, L15, L20 y Bla-2 a las que previamente se introdujo mediante PCR una etiqueta (tag) de 10 aa (confirmada por secuenciación). La inmunodetección se realizó a partir de extractos totales de la fracción soluble e insoluble con anticuerpos monoclonales anti tag-10 (figura 27). En las mutantes L3 y L13 no se logró inmunodetectar a la proteína (datos no mostrados) posiblemente porque la cantidad de enzima que se produce es poca, bajo el límite de resolución del método de revelado de la reacción acoplada a fosfatasa alcalina, que tiene un límite de sensibilidad de 100 pg.



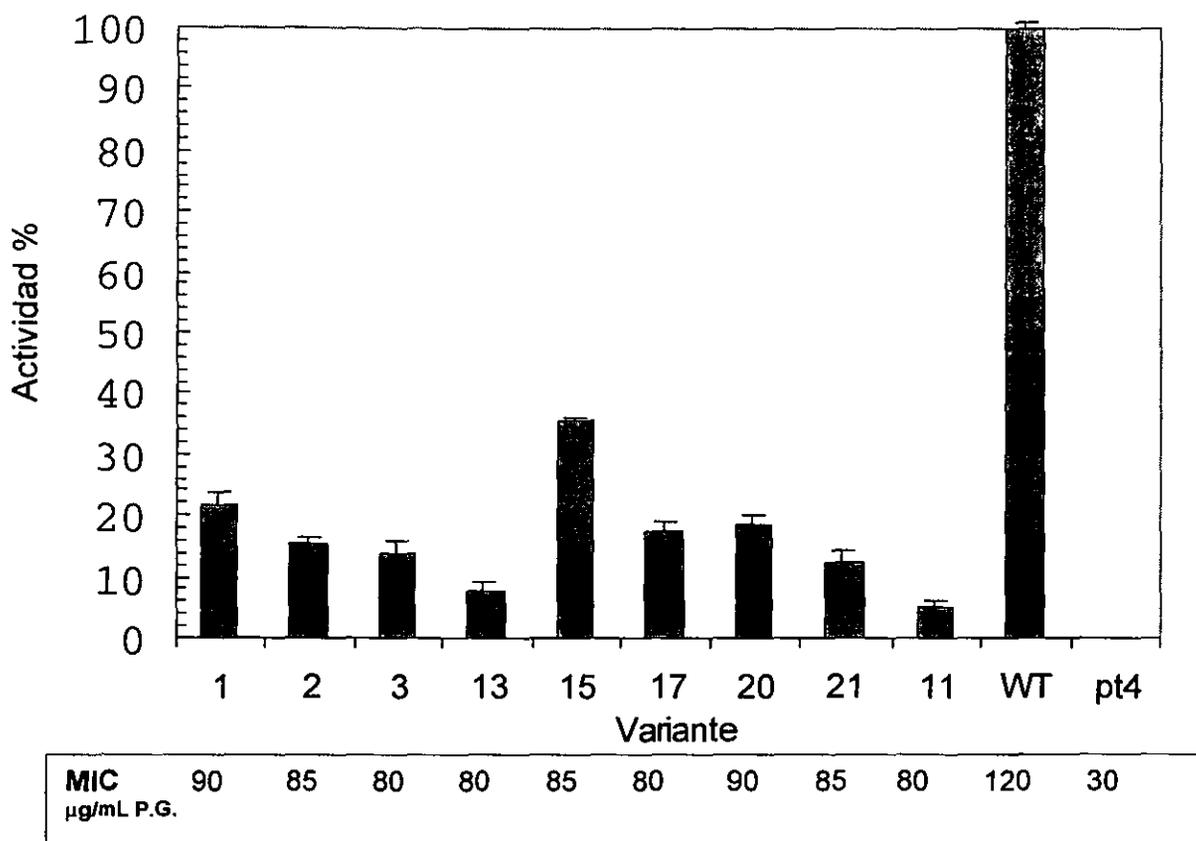
**Figura 27.** Inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti tag-10, a partir de extractos totales de proteína de diferentes mutantes expresadas bajo promotor *blac* en el vector pT4 y transformadas en XL1-Blue. En todos los casos se muestran las fracciones solubles. La banda de Ac corresponde a un anticuerpo catalítico que tiene muy pobres niveles de expresión.

## Actividades de extractos totales de proteínas

Una vez que se adaptaron las condiciones para medir actividad de penicilino acilasa por el método de PDAB, se determinó la actividad a partir de extractos proteicos totales de las mutantes L1, L2, L3, L13, L15, L20, L21 y L11 (figura 29) así como de la enzima silvestre (WT) transformadas en la cepa XL1-Blue. Adicionalmente se determinó la actividad de extractos proteicos totales de las mutantes pbla2, pbla5, apg2 y apg5 transformadas en la cepa de selección *E. coli* XL1-Blue PACYCPKGS-9 (figura 30), en ambos casos se consideró como control, el extracto de proteínas de la cepa XL1-Blue transformada con el plásmido pT4 sin inserto. Para la determinación de actividad se ajustó la concentración total de proteínas por el método de Bradford (figura 28-a) a 100  $\mu\text{g}$  totales. Para determinar la actividad fue necesario interpolar en una curva de calibración de 6-APA los valores de absorbancia a 412 nm obtenidos de las diferentes variantes utilizando la ecuación de la recta (figura 28-b), esta actividad se representa en relación porcentual con respecto a la enzima silvestre en la figura 29. El control de la cepa presentó un valor que se consideró como ruido de fondo, el cual fue restado a todos los ensayos de actividad de las variantes (figura 29). En el recuadro inferior a la figura 29 se muestran los valores de MIC obtenidos de las diferentes variantes.

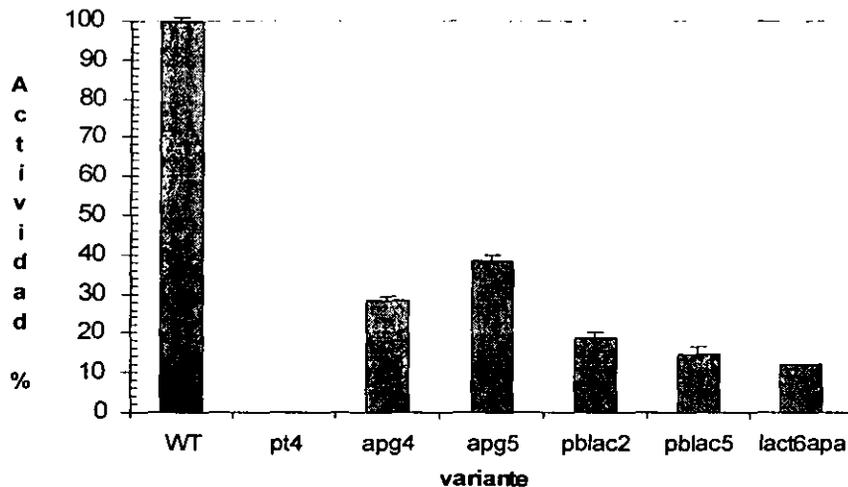


**Figura 28.** a) Curva de calibración para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford. b) Curva de calibración para determinar la concentración de 6-APA producido en los diferentes extractos por el método PDAB.



**Figura 29.** Determinación de actividad de penicilino acilasa de extractos totales de proteína a 37 °C. WT representa a la enzima silvestre. pT4 representa al control de cepa, 1, 2, 3, 13, 15, 17, 20, 21, 11 son variantes monoméricas de la penicilino acilasa expresadas en la cepa XL1-Blue. La actividad está referida a la actividad de la enzima silvestre. Las desviaciones estándar fueron obtenidas de tres mediciones realizadas en idénticas condiciones. En el recuadro inferior se muestran los valores de MIC obtenidos para cada mutante a 37 °C y a 28 °C para la de tipo silvestre en la cepa de selección XL1-Blue PACYCPKGS-9.

Para tener un valor comparativo de las variantes seleccionadas con la cepa XL1-Blue PACYCPKGS-9, fue necesario tener como control al extracto total de proteínas de la cepa XL1-Blue-PACYCPKGS-9 para cuantificar si la  $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA interfiere con el método de determinación de actividad de penicilino acilasa. Como se observa en la figura 30 aparentemente la cepa control da cierto valor de actividad de penicilino acilasa, por lo que es necesario restar este valor a las actividades determinadas de extractos de la cepa XL1-Blue-PACYCPKGS-9.



**Figura 30.** Actividad penicilino acilasa determinada por el método PDAB a partir de extractos de proteínas. WT es la enzima silvestre transformada en la cepa XL1-Blue, pt4 es el control de cepa, apg4, apg5, pblac2 y plac5 son variantes monoméricas de la penicilino acilasa transformadas en la cepa de selección XL1-Blue PACYCPKGS-9, lact6apa es la cepa de selección.

#### Purificación de enzimas con actividad de penicilino acilasa

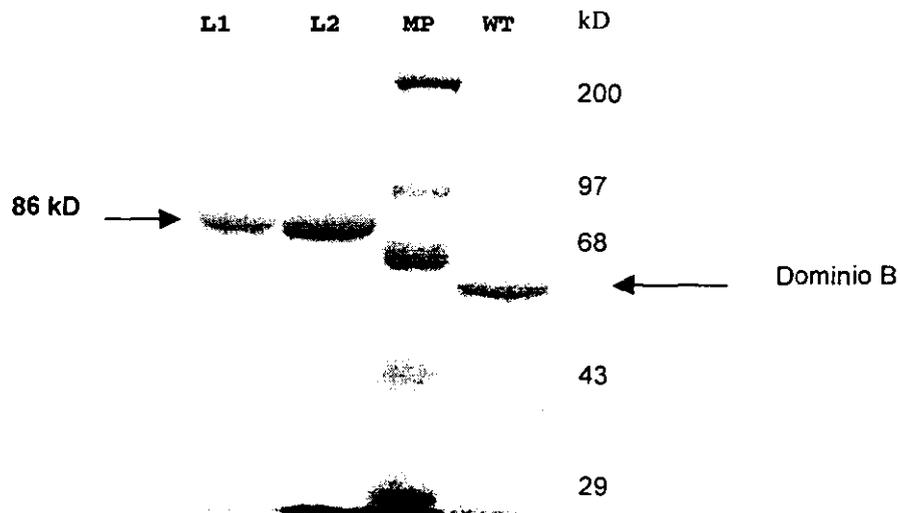
Se seleccionaron tres proteínas a las cuales se introdujo una etiqueta de seis histidinas a nivel de DNA por medio de PCR con el fin de poder purificarlas por afinidad a níquel. Se hicieron las PCR's para adicionarles la etiqueta (figura 31), una vez purificadas y digeridas en los sitios de restricción Mlu I y Spe I se clonaron en el vector apropiado. El vector en este caso fue preparado a partir de la mutante Pt4-hi3 previamente clonada en el plásmido pT4 bajo el promotor *blac*, aprovechando un sitio de restricción Mlu I al final del dominio B, se dejó como parte del vector tres cuartas partes del gen permutado circularmente. Una vez que se obtuvieron colonias, se purificó el plásmido de cada transformación y se secuenciaron para ver la integridad de la etiqueta.



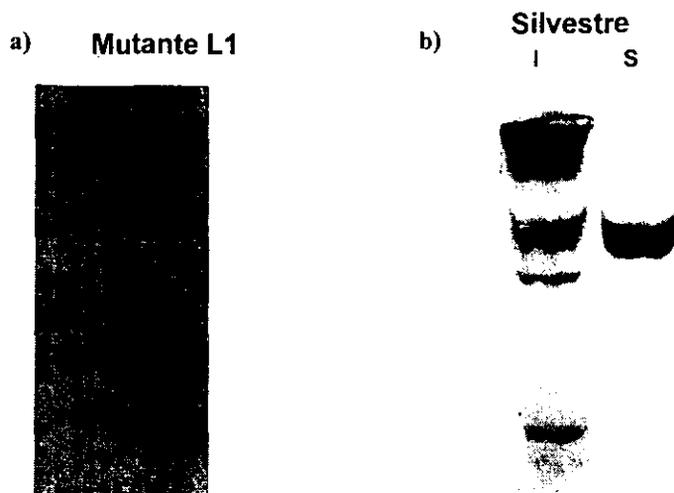
**Figura 31.** PCR para introducir una etiqueta de (His)6. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb plus, carril2: PCR amplificada del fragmento de la WT para introducir (His)6-tag, carril 3: PCR amplificada del fragmento de la mutante L1 para introducir (His)6-tag.

Se logró semipurificar a las enzimas mutantes L1 y L2 así como a la enzima silvestre por afinidad a  $\text{Ni}^{2+}$  mediante la etiqueta de (His)<sub>6</sub> adicionada a nivel de gen (figura 32). A pesar de que las enzimas monoméricas fueron clonadas en el vector de sobreexpresión pET y que se barrió un intervalo de inducción de concentraciones de IPTG desde 0.1 mM hasta 1 mM, la expresión fue muy similar en todos los casos, excepto en 1 mM donde la expresión disminuyó a una quinta parte (datos no mostrados). Por su parte la enzima silvestre bajo el promotor *trc* se expresa en niveles que hizo posible la purificación de la enzima, sin embargo se observa que la proteína posiblemente forma cuerpos de inclusión, ya que mediante análisis de inmunodetección de la penicilino acilasa en la fracción insoluble se detectó la acumulación del precursor, del dominio B y productos de degradación (figura 33). Desafortunadamente no se puede decir algo respecto al dominio A, debido a que la etiqueta fue colocada en el carboxilo terminal de la proteína y la información del dominio A no hay forma de identificarla.

De las enzimas L1 y L2 se obtuvo alrededor de 1 mg de enzima semipurificada por litro de cultivo, con respecto a la enzima silvestre se obtuvieron alrededor de 3 mg por litro de cultivo. Para verificar que las proteínas corresponden a las que buscamos se hicieron ensayos de inmunodetección a partir de las enzimas semipurificadas (figura 33). Para la enzima L1 se obtuvo la banda esperada de alrededor de 86 kD y algunos productos de degradación de la enzima, por su parte la enzima silvestre se logró inmunodetectar mediante el dominio B, el precursor y algunos productos de degradación. De la fracción insoluble se pudo identificar la acumulación del precursor, del dominio B y algunos productos de degradación (figura 33).



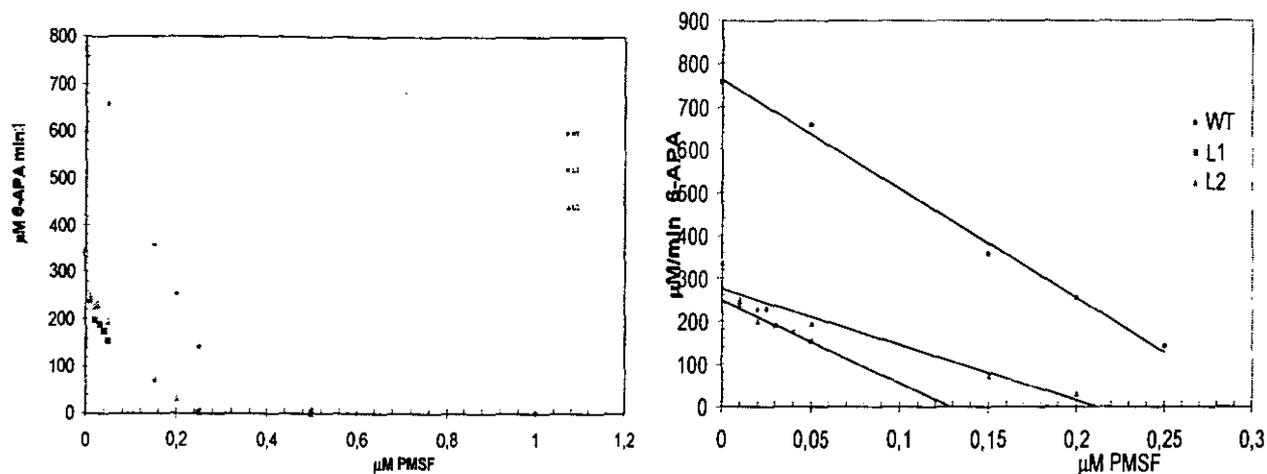
**Figura 32.** Enzimas semipurificadas L1, L2 y WT por afinidad a níquel visualizadas en un gel de acrilamida al 7.5% en condiciones desnaturalizantes.



**Figura 33.** Inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti-tag10 para confirmar el producto de purificación de proteína. a) enzima L1 semipurificada. b) enzima silvestre, carril 1: fracción insoluble carril 2: fracción soluble.

#### Titulación de sitios activos

El PMSF es un inhibidor irreversible altamente específico de la penicilino acilasa que actúa directamente sobre la serina catalítica (Eraslan A., et al 1991). Para conocer la cantidad real de enzima activa, se hicieron ensayos de inhibición con diferentes concentraciones de PMSF (figura 34), considerando una relación molar 1:1 entre el PMSF y los sitios activos de la enzima. En cada caso, los ensayos de titulación se realizaron con  $0.5 \mu\text{M}$  de enzima semipurificada (determinados por Bradford) utilizando diferentes concentraciones de PMSF hasta la inhibición total (figura 34-a). Las ecuaciones de las rectas fueron obtenidas con los puntos anteriores a la inhibición total (figura 43-b). Las ecuaciones obtenidas en cada caso fueron  $L1 = -1941x + 249.19$  ( $r^2 = 0.9421$ ),  $L2 = -1305.2x + 277.32$  ( $r^2 = 0.9263$ ) y  $WT = -2543x + 764.49$  ( $r^2 = 0.9954$ ); a partir de ellas se determinaron los sitios activos totales en el eje de las abscisas cuando la ordenada es igual a cero. Los valores de sitios activos determinados fueron  $0.3006 \mu\text{M}$  para la enzima silvestre,  $0.128 \mu\text{M}$  para la enzima L1 y  $0.2124 \mu\text{M}$  para la enzima L2.



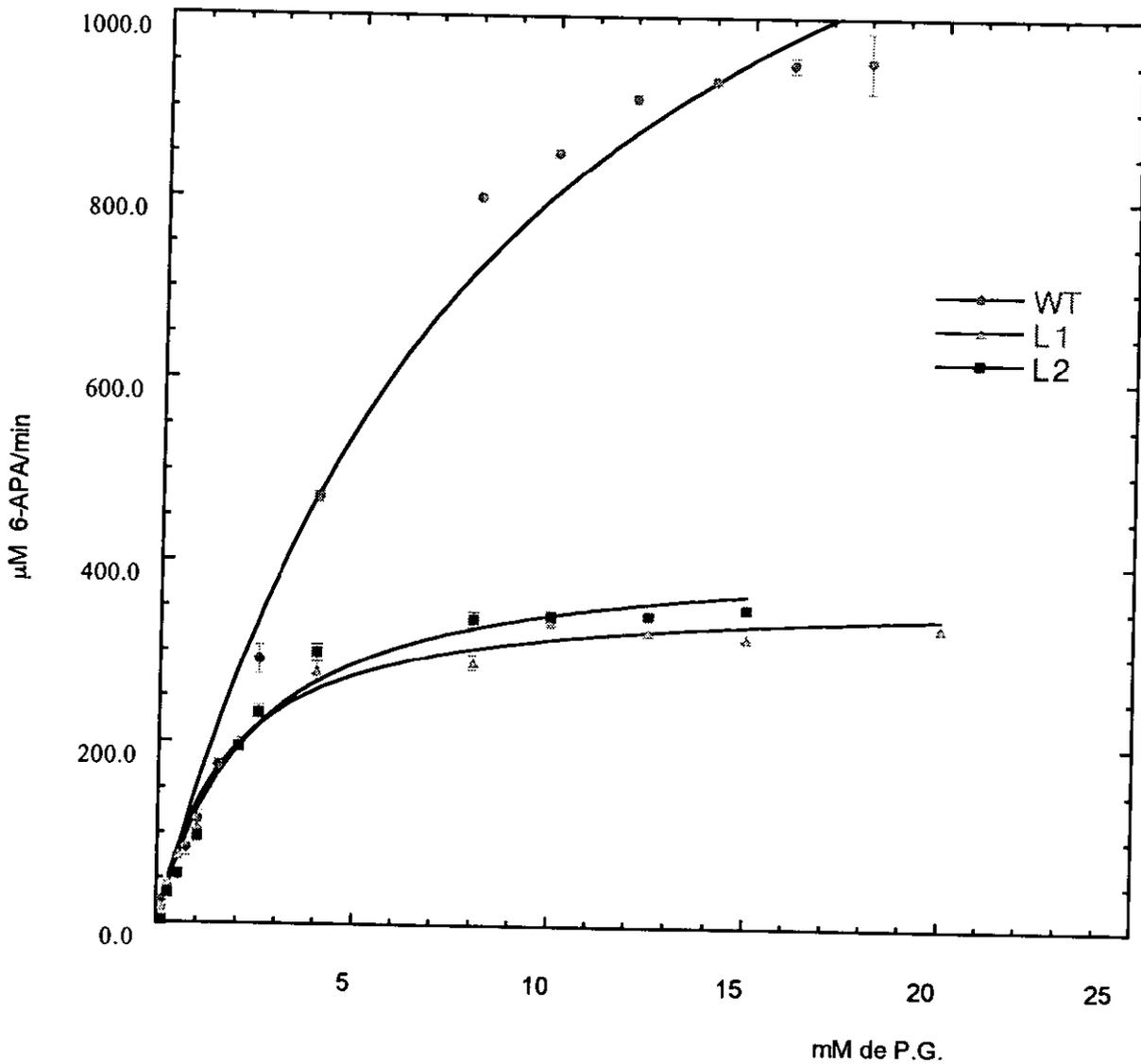
**Figura 34.** Titulación de sitios activos por PMSF. a) inhibición completa b) puntos para obtener las ecuaciones de la recta.

### Caracterización cinética de las mutantes L1, L2 y la enzima silvestre

Para la caracterización de los parámetros catalíticos se realizaron cinéticas de velocidades iniciales con las diferentes enzimas a  $37^\circ\text{C}$  utilizando como sustrato penicilina G a diferentes concentraciones, la cantidad de proteína activa utilizada en cada caso fue  $0.3006 \mu\text{M}$  de enzima silvestre,  $0.128 \mu\text{M}$  de la enzima L1 y  $0.2124 \mu\text{M}$  de la enzima L2 (figura 35). Mediante un análisis tipo Michaelis-Menten se determinó la  $K_m$  y  $V_{max}$  de cada enzima, la  $K_{cat}$  se calculó dividiendo el valor de la  $V_{max}$  entre la concentración de proteína activa previamente determinada por titulación por PMSF para cada caso (tabla 7).

**Tabla 7.** Parámetros catalíticos de actividad de penicilino acilasa utilizando penicilina G como sustrato determinados a  $37^\circ\text{C}$ .

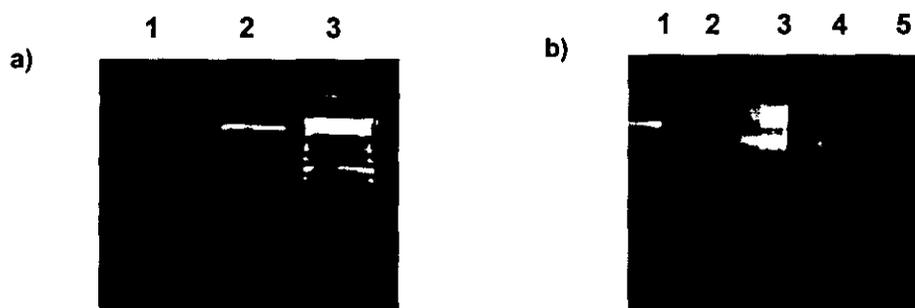
Enzima	conector	$K_m$ mM P.G.	$V_{max}$ $\mu\text{M}$ 6-APA	$K_{cat}$ $\text{seg}^{-1}$	$K_{cat}/K_m$ $\text{seg}^{-1} \text{mM}^{-1} \text{P.G.}$
L1	NEGM	$2.049 \pm 0.38$	$397.36 \pm 32.70$	$51.619 \pm 4.24$	$25.63 \pm 2.41$
L2	PGLR	$2.298 \pm 0.09$	$415.56 \pm 1.66$	$32.980 \pm 0.10$	$14.37 \pm 0.52$
WT		$9.052 \pm 0.28$	$1,550.73 \pm 43.96$	$85.979 \pm 1.99$	$9.498 \pm 0.02$



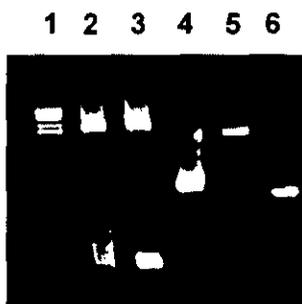
**Figura 35.** Representación de las cinéticas de velocidades iniciales de las enzimas L1, L2 y silvestre realizadas a diferentes concentraciones de penicilina Ga 37°C en un amortiguador de fosfatos pH 7.8. Cada punto es el promedio de tres determinaciones.

### Evolución dirigida de la mutante L1

Para tratar de obtener una mutante monomérica más activa o con menos problemas de expresión, se sometió el gen de la mutante L1 a mutagénesis mediante la técnica de recombinación sexual (gene Shuffling). Se lograron establecer las condiciones para mutagenizar el gen de la mutante L1 por esta técnica (figura 36 y 37). Debido a que se tuvieron muchos problemas al reensamblar el gen por recombinación homóloga, se amplificaron los dos dominios por separado, éstos se clonaron en vectores en donde el fragmento mutagenizado complementaba con el resto del gene para restituir la actividad aprovechando el sitio de restricción Mlu I que se encuentra al final del dominio B. Sin embargo, cuando los bancos fueron transformados a la cepa de selección, no se logró obtener mutantes que crecieran en un MIC mayor al de L1.



**Figura 36.** Gene shuffling. A) Fragmentación del gen mediante DNAsa, carril 1 tratamiento con DNAsa: 7 min 37 °C , carril 2 gen íntegro de la mutante L1 y carril 3 marcador de peso molecular 1Kbplus. B) Reensamblado del gen por recombinación homóloga, carril 1:marcador de peso molecular, carril 2:proveniente de 10 µL de fragmentos de DNAsa purificados, carril 3: proveniente de 20 µL, carril 4: proveniente de 30 µL y carril 5:control negativo de PCR.



**Figura 37.** Gene shuffling. Reensamblado del gen. Carril 1 marcador de peso molecular 1Kbplus, carril2 y carril 3 :amplificación del dominio B con diferentes condiciones, carril 4: amplificación del dominio A, carril 5:control de tamaño del dominio B y carril 6: control de tamaño del dominio A.

## DISCUSION

### Sistema de selección

En este trabajo se diseñó una cepa de selección de actividad de penicilino acilasa en *E. coli* que nos permite identificar variantes que presenten esta actividad.

Se realizó el sistema de selección en dos cepas de *Escherichia coli* debido a que se ha observado un efecto en la producción de la penicilino acilasa de acuerdo a la cepa utilizada (Chou. et al, 1999). Se escogió la cepa XL1-Blue ya que es una cepa de alta eficiencia de transformación, utilizada frecuentemente en la obtención de bibliotecas de mutantes y la JM101 porque es una buena productora de penicilino acilasa (Merino et al, 1992).

Las cepas XL1-Blue PACYCPKGS-9 y JM101 PACYCPKGS-9 fueron generadas mediante la introducción de una  $\beta$ -lactamasa que les confiere resistencia a 6-APA, un subproducto tóxico a la bacteria que se obtiene de la hidrólisis de la penicilina G cuando está presente la actividad de penicilino acilasa. La  $\beta$ -lactamasa con la que se realizaron las cepas de selección hidroliza el 6-APA formando otros productos no tóxicos a la célula. La mutación del Asp de la posición 132 por Asn que presenta esta  $\beta$ -lactamasa permitió que la eficiencia catalítica de esta mutante sobre la penicilina G, su sustrato natural disminuyera 18 veces y su  $K_{cat}$  se incrementara 2.5 veces sobre el 6-APA, con respecto a la enzima de tipo silvestre a un pH 7.0 (Osuna, et al, 1995). Aunque la actividad de hidrolizar penicilina G no se abolió en esta enzima, el incremento en su eficiencia catalítica con respecto al 6-APA, permitió obtener las cepas de selección de variantes con actividad de penicilino acilasa.

Las cepas XL1-Blue y JM101 presentaron un MIC(concentración mínima inhibitoria) de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para penicilina G. Cuando se les transformó la  $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA, este valor se incrementó hasta 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (tabla 2). Con respecto al 6-APA las cepas tienen un MIC de 15 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la JM101 y XL1-Blue respectivamente. Al introducir la  $\beta$ -lactamasa específica para 6-APA, su MIC incrementó hasta una concentración de 200 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de 6-APA respectivamente para la JM101 PACYCPKGS-9 y XL1-Blue PACYCPKGS-9 (tabla 2), es decir alrededor de 12.5 veces más.

Existen cepas reportadas en la literatura, que identifican la actividad de penicilino acilasa, la más usada es la de *Serratia marcescens* ATCC27117 (Meevootisom, et al, 1983), que al igual que todas las cepas de selección de actividad de penicilino acilasa, tiene la característica de ser resistente a 6-APA y sensible a penicilina G. Con esta cepa se ha logrado identificar cepas sobreproductoras de penicilina acilasa así como enzimas mutantes. Recientemente otras cepas

han sido desarrolladas por un grupo Taiwanes, ellos han generado mediante métodos químicos las cepas mutantes HB101PAC, MD7 y MD $\Delta$ 7 (Chou et al,1999-a).

Nuestras cepas de selección se compararon con la cepa HB101PAC que fue gentilmente regalada al Dr. Osuna, esta cepa presentó un MIC de 10  $\mu$ g/mL y 140  $\mu$ g/mL en penicilina G y 6-APA respectivamente (tabla 2). Comparados con las cepas XL1-Blue PACYCPKGS-9 y JM101 PACYCPKGS-9, el MIC de la HB101PAC es menor para los dos antibióticos, pero los valores de MIC eliminando el ruido de fondo (resistencia a 6-APA y P.G.en las cepas sin la presencia de la  $\beta$ -lactamasa) fueron de 110, 125 y 170  $\mu$ g/mL para HB101PAC, JM101 PACYCPKGS-9 y XL1-Blue PACYCPKGS-9 respectivamente. Por lo que podemos decir que las cepas desarrolladas en este trabajo presentan una resistencia mayor a 6-APA.

Debido a que el mecanismo de maduración de la penicilino acilasa silvestre es dependiente de temperatura era necesario identificar si las características de las cepas de selección no se afectan con la temperatura de crecimiento. Para, ello se realizaron ensayos de MIC a las temperaturas de 28 y 37 °C de las cepas de selección en donde no se observaron diferencias en sus limites de detección (datos no mostrados).

Para verificar si las cepas de selección permitirían identificar mutantes con actividad de penicilino acilasa, se realizaron ensayos transformando el gen silvestre de la penicilino acilasa en estas cepas. En los ensayos realizados a 28 °C se obtuvieron colonias en concentraciones mayores de 60  $\mu$ g/mL de penicilina G (tabla 3), a diferencia de los obtenidos a 37° C en donde solo crecieron colonias en el ruido de fondo de la cepa de selección (datos no mostrados), este efecto se explica, en base a que a 37 °C el mecanismo de maduración no es funcional y la enzima no se encuentra en forma activa, por lo tanto concentraciones mayores de 60  $\mu$ g/mL de penicilina G, resultan tóxicas a las bacterias inhibiendo su crecimiento. En la cepa HB101PAC también se observó este efecto, lo cual coincide con lo reportado en la literatura, en el sentido de que la enzima solo se produce en el intervalo de temperatura de 25 a 30 °C teniendo su valor óptimo en 28 °C (Sizman, et al, 1990).

Para observar el efecto que tienen diferentes niveles de expresión de la penicilino acilasa en las cepas de selección, se realizaron ensayos con dos promotores: uno débil (*blac*) y otro de mediana fuerza transcripcional (*trc*). Los valores de MIC obtenidos a 28°C en ambos ensayos muestran el comportamiento esperado; bajo el promotor fuerte (*trc*) se produce mayor cantidad de proteína y por tanto el valor de MIC es mayor con respecto a los obtenidos cuando el gen se halla bajo la transcripción de un promotor débil donde se produce menor cantidad de proteína (tabla 3).

La cepa JM101 PACYCPKGS-9 siempre presentó un MIC menor respecto a la cepa XL1-Blue PACYCPKGS-9 cuando expresaba la penicilino acilasa bajo el mismo promotor y en las mismas condiciones de cultivo.

### **Límite de resolución de las cepas de selección**

Basándose en los MIC's de las cepas XL1-Blue y JM101 a penicilina G y 6-APA (tabla 2) se puede considerar, que una mol de 6-APA le resulta igual de tóxica a la bacteria como una mol de penicilina G. Como la resistencia a 6-APA es debida a la  $\beta$ -lactamasa modificada, el límite superior en la selección queda delimitado por el MIC a este antibiótico en las dos cepas cuando tienen presente este gen.

Considerando lo anterior el intervalo funcional de las cepas de selección quedó establecido a partir de 65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en ambas cepas hasta una concentración de 200 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de penicilina G en las cepas XL1-Blue PACYCPKGS-9 y JM101 PACYCPKGS-9 respectivamente (tabla 2).

Para la selección, es necesario considerar factores como la cantidad de enzima que se produce en forma activa, los parámetros catalíticos de la enzima, su estabilidad, solubilidad y en gran medida la eficiencia del mecanismo post-traduccional (translocación para el caso de mutantes monoméricas o translocación y procesamiento para la enzima heterodimérica). Para identificar variantes con actividad de penicilino acilasa, se pueden expresar las bibliotecas bajo los promotores *trc* y *bla*, los criterios de su utilización dependerán de la característica que se quiera modificar.

### **Mutantes monoméricas**

Uno de los problemas en la búsqueda de mutantes fue obtener el tamaño adecuado de la biblioteca que cubriera todas las posibilidades generadas con la estrategia mutagénica diseñada. Para resolver este problema, se siguieron básicamente cuatro estrategias, finalmente en la biblioteca más grande se obtuvieron  $1.2 \times 10^6$  variantes, la cual fue obtenida clonando un fragmento más pequeño que contenía un fragmento del dominio B, la zona del conector y el dominio A. Dentro de los obstáculos que se encontraron en la generación de la biblioteca de genes permutados circularmente de la penicilino acilasa fueron: la obtención de genes truncados en la cepa XL1-Blue (utilizada en la obtención de la biblioteca de mutantes), la selección frecuente de mutantes con codón de paro en el conector, los bajos niveles de expresión y la baja frecuencia de selección de variantes.

En la primera estrategia utilizada para obtener la biblioteca de genes permutados circularmente, se utilizó un promotor de mediana fuerza transcripcional (*trc*). Esto parecía lo más adecuado,

debido a los resultados obtenidos de la expresión de la enzima silvestre bajo este promotor, donde se observó que el MIC en la cepa de selección era fácilmente discernible del ruido de fondo. A pesar de que se realizaron modificaciones en el protocolo de ligación tratando de mejorar el tamaño del banco, solo se logró identificar una mutante que presentó un codón de paro en el conector y algunas mutantes que solo amplificaban el dominio A a pesar de que todos los pasos de la clonación fueron cuidadosamente monitoreados.

Para avanzar más en la confirmación de la hipótesis sobre el efecto tóxico que pudiera causar la proteína monomérica a la bacteria, la biblioteca se clonó en un vector con un promotor regulable a nivel transcripcional (pTHIO-C, promotor *trc*). Esta biblioteca en estado reprimido fue de 264,000 variantes sin ser retada en la cepa de selección, sin embargo, en estado inducido su tamaño se redujo alrededor de un 45.46%, lo que sugiere que una parte de la población generada se perdió por un efecto de intoxicación de las cepas cuando tienen presente a la penicilina acilasa de tipo monomérico. Este efecto tóxico pudiera deberse o bien a problemas de plegamiento presentados por algunas variantes o a la poca tolerancia de la bacteria por la actividad enzimática.

Considerando un efecto negativo en las bacterias causado por las proteínas monoméricas, se clonó la biblioteca en el mismo vector utilizado en la primera estrategia, pero ahora con un promotor de menor fuerza transcripcional (*blac*).

En esta estrategia se obtuvo un mayor número de mutantes, pero al igual que en las anteriores estrategias, antes de someterse a selección en penicilina G se identificaron mutantes con codones de paro en el conector y deleciones que causan corrimiento en el marco de lectura. Una vez que esta biblioteca fue sometida a selección se obtuvieron mutantes con MIC en un intervalo de 65 a 95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . De todas las variantes que fueron sometidas a selección solo el 1% logró sobrevivir en penicilina G.

En la cuarta estrategia, para evitar un posible problema en la reacción de ligación por el tamaño del vector (2000 pb) y del inserto (2400 pb), se clonó solo un fragmento del gen, para lo cual se aprovechó la existencia de un sitio de restricción Mlu I dentro del gen, de esta forma solo se clonó una fracción pequeña del dominio B, la zona del conector y todo el dominio A (880 pb) en un vector que contenía tres cuartas partes del gen permutado circularmente. El tamaño de la biblioteca por esta estrategia fue de  $1.2 \times 10^6$  variantes en donde se observaron tres tamaños distintos de colonia, al ser crecidas sin presión de selección en penicilina G.

La obtención de tres fenotipos diferentes en relación al tamaño de colonia, favorece la hipótesis de una preselección de la cepa de *E. coli* por aquellas variantes monoméricas que le resultan menos tóxicas. De las mutantes que presentaron un fenotipo de tamaño de colonia grande, se

puede decir que no causaron un efecto negativo en el crecimiento, sin embargo al ser secuenciadas a nivel de DNA todas presentaron un codón de paro en el conector, en estas condiciones, solo es posible la traducción del dominio B de la proteína, que a pesar de tener a la serina catalítica, no presenta actividad por sí mismo (Burtscher H. et al, 1992; Shamolina T. A. et al, 2000). En cambio, las mutantes que presentaron integridad en el conector presentaron un tamaño de colonia muy pequeño y en algunos casos mediano (tabla5), lo que indica que existe un efecto negativo en la cepa por la presencia de las enzimas monoméricas.

Cuando esta biblioteca se sometió a selección en la cepa XL1-Blue PACYCPKGS-9, el número de variantes que sobrevivieron fue menor del 1% de las variantes originales. Las mutantes que tenían íntegro su conector presentaron un MIC en el intervalo de 80 a 90  $\mu\text{g/mL}$  de penicilina G y como era de esperarse aquellas mutantes con deleciones en el conector no permitieron crecer a la cepa de selección en concentraciones de P.G. mayores a 60  $\mu\text{g/mL}$ .

Para verificar si la producción de la proteína es dependiente de la cepa, se expresó a la enzima silvestre y a la mutante monomérica L1, en las cepas JM101 y XL1-Blue y se realizó una inmunodetección (figura 25). Con respecto a la enzima silvestre se observó que en la fracción soluble de la cepa JM101 se produce cerca del doble de enzima procesada con respecto a la cepa XL1-Blue.

En ambas cepas se observó la formación de agregados tanto del precursor como del dominio B, con esto se podría suponer que una gran cantidad de proteína no se pliega adecuadamente para formar proteína activa, sin embargo, como la información del dominio A no está disponible por este método, no se puede discernir, si no se forma proteína activa debido a que el paso de excisión del endopéptido del dominio A no se lleva a cabo eficientemente y de esta manera la proteína tiende a agregarse o si la disponibilidad de los dos dominios para poder plegarse no es asequible. Con respecto a la producción de la enzima monomérica, se observó que en ambas cepas se produce en las mismas proporciones y que casi la mitad se encuentra en la fracción insoluble (tabla 6). Comparando las fracciones solubles en la cepa XL1-Blue, de la mutante monomérica (figura 25, carril 2) y la enzima silvestre (figura 25, carril 4), se observó que la producción de la enzima monomérica disminuyó en un 70 %. Con estos resultados, podría pensarse que la enzima monomérica es susceptible de proteasas, debido a un plegamiento inadecuado.

Cuando se realizaron geles de SDS-PAGE para visualizar las proteínas tanto de la fracción soluble como insoluble, no se logró identificar por tinción de Coomassie, a la enzima silvestre (datos no mostrados) ni a un grupo de enzimas mutantes (figura 26). Para tratar de definir la cantidad de enzima monomérica que se estaba produciendo en la bacteria, se hicieron ensayos

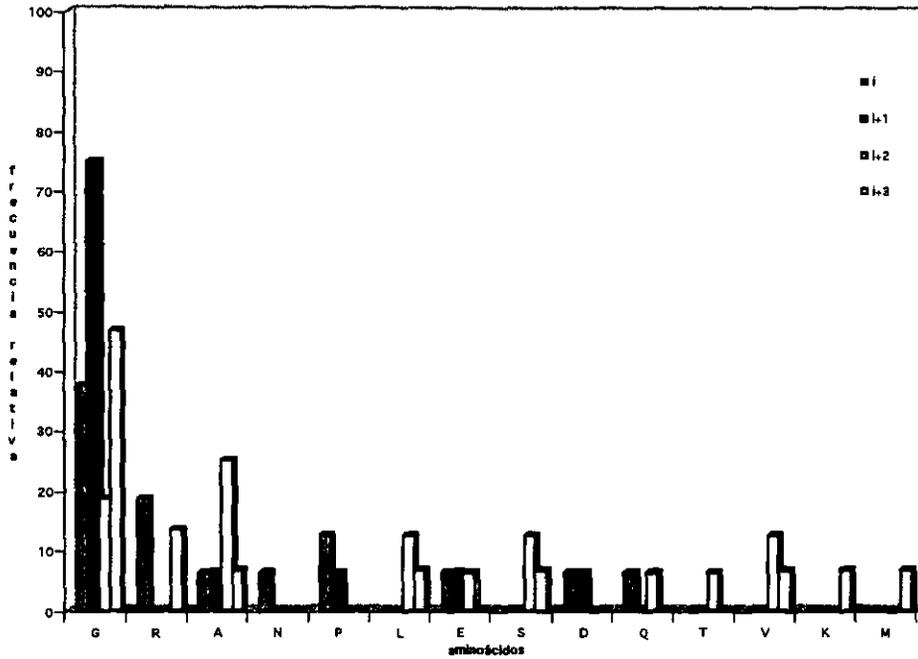
de inmunodetección (figura 27). Estos resultados sugieren que la cinética de plegamiento de las variantes podría estar afectada y que la mayor parte de la proteína producida podría ser susceptible a proteasas en el citoplasma (Lon o ClpX) o en el periplasma (Tsp o HtrA) o bien que existe un compromiso entre la cantidad de proteína producida y la viabilidad de la bacteria.

### **Análisis del conector**

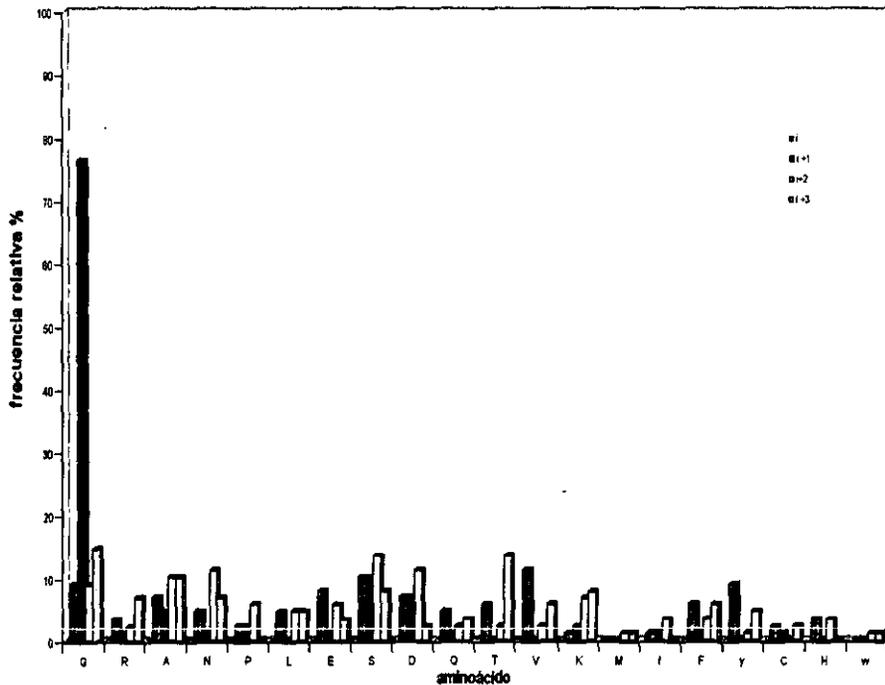
En el diseño de la permutación circular de la penicilino acilasa, se pensó que el conector podía tener una mayor predisposición a formar una vuelta beta (beta-turn) debido a que los dos elementos de estructura secundaria a unir eran dos betas plegadas antiparalelas. Las vueltas beta de cuatro posiciones en base a la conformación que adoptan tridimensionalmente se clasifican en nueve subtipos (I, II, VII, I', II'', VIa1, VIa2, Vib y IV) (Hutchinson and Thornton, 1994). Analizando las frecuencias a nivel de estructura primaria de vueltas beta II'', se observa que la glicina en la posición  $i+1$  representa el 75%, en la posición  $i+3$  un 15% y en las posiciones  $i$  e  $i+2$  representa un 10% (figura 39).

El análisis de la composición a nivel de estructura primaria de 19 conectores obtenidos de las diferentes mutantes monoméricas, muestra una marcada tendencia a presentar glicina en las cuatro posiciones ( $i$ ,  $i+1$ ,  $i+2$ ,  $i+3$ ) que forman el conector. En la posición  $i+1$  se obtuvo la frecuencia relativa más alta con un 75% como en la vuelta beta II', en la posición  $i+3$  la frecuencia fue de alrededor de un 45%, en la posición  $i$  alrededor de un 38% y la posición  $i+2$  presentó la menor frecuencia con un 20% (figura 38), esto es favorable si consideramos que la glicina en general se presenta con alta frecuencia en vueltas betas debido a que permite cierta flexidad.

Para un análisis con mayor confiabilidad es necesario analizar un número mayor de conectores. Con los 19 conectores analizados, se observa que al igual que en la vuelta beta II'' se tiene una marcada selección de glicina en la posición  $i+1$  y en la posición  $i+3$ , por lo que puede ser un buen indicio de que se haya formado una vuelta beta en el conector de la enzima monomérica. Sin embargo, para identificar el tipo de motivo estructural en el conector así como posibles cambios globales en la estructura de la proteína monomérica es necesario contar con estudios estructurales de ella.



**Figura 38.** Frecuencia relativa de aminoácidos en las cuatro posiciones del conector introducido en el gen de la penicilino acilasa para obtener variantes monoméricas.



**Figura 39.** Frecuencia relativa en la composición de la vuelta beta II<sup>a</sup>. Los datos analizados fueron tomados de una preselección de 68 vueltas beta II<sup>a</sup> realizada por Hutchinson en 1994.

Por otro lado, la frecuente aparición de glicinas en los conectores podría deberse a un efecto relacionado con el oligonucleótido mutagénico utilizado en la construcción de los genes permutados circularmente. Cuando se sintetiza un oligonucleótido con estas características, a pesar de que las bases nucleótídicas se inyectan equimolarmente en un robot, existe un intervalo de error en el que se puede presentar, que una base esté más representada con respecto a las otras tres y al momento de hacer la PCR se generen más templados de ella y en la transformación se obtengan en mayor proporción. Con los conectores que tienen codón de paro, se podría ver un posible sesgo por el oligonucleótido, sin embargo solo se cuenta con cuatro secuencias diferentes de este tipo, en las cuales dos tienen glicinas y dos no presentan glicinas. Otro residuo con frecuencia relativa importante es la alanina en la posición  $i + 2$  llama la atención debido a que fue mayor que la observada con la glicina en esa misma posición. Sin embargo, aunque no es muy frecuente en las vueltas betas, la alanina en esta posición se ve favorecida en las vueltas betas tipo I, II, VIII, I' y II' (Hutchinson, 1994).

En las secuencias de los conectores en general se observa una frecuencia mayor por residuos hidrofílicos que por residuos hidrofóbicos, esto concuerda con las vueltas beta que se caracterizan por tener su superficie expuesta al solvente por lo cual están formadas principalmente por residuos hidrofílicos.

Cuando las mutantes L1, L2, L3, L13, L15, L17, L20, L21, L11, pblac2, pblac 5, apg4 y apg5 se analizaron por actividad a partir de extractos totales de proteínas así como ensayos de MIC en penicilina G en la cepa de selección XL1-Blue PACYCPKGS-9 se pudo conocer más acerca de sus características (figura 29 y 30). Se observa una relación del MIC con respecto a la actividad de extracto, a menor MIC se presenta una actividad menor.

Todas las mutantes presentaron actividad de penicilino acilasa en el intervalo del 5 al 35% de la actividad de la enzima silvestre. A pesar de que las mutantes L3 y L13 no se pudieron identificar por inmunodetección, se detectó actividad en la cepa de selección XL1-Blue PACYCPKGS-9 y actividad en extractos totales (figura 29). La actividad de la enzima silvestre fue un 65% mayor, respecto a la mutante con mayor actividad determinada de extracto denominada L15, pero en base a los resultados de inmunodetección podemos decir que esos valores no son muy comparativos, ya que la cantidad producida de la enzima silvestre con respecto a las enzimas monoméricas fue aproximadamente 35% mayor en la cepa XL1-Blue.

Para una comparación más cuantitativa de las enzimas monoméricas con respecto a la enzima silvestre era necesario determinar la actividad con la misma cantidad de proteína. Por lo cual, se semipurificaron las enzimas monoméricas L1 y L2 y la enzima silvestre. Como se mencionó

anteriormente, las enzimas al ser expresadas en el vector de expresión pET, no se lograron sobreproducir como ocurre en el caso de otras proteínas (datos no mostrados).

Para cuantificar la cantidad total de proteína activa, se titularon los sitios activos con un inhibidor específico de la penicilino acilasa (PMSF), las tres enzimas se inhibieron al 100% (figura 34-a), las pendientes de las enzimas monoméricas no fueron del todo lineales (figura 34-b), la cual pudiera deberse a una pérdida de especificidad de las enzimas monoméricas por el inhibidor, aunque de este efecto no se ha discutido al respecto, coincide con algunas mutantes reportadas (del Rio G. et al, 1995; Prieto I. et al, 1990). De esta manera se pudiera estar sobrestimando la cantidad de sitios activos sobre todo en la mutante L1 donde se obtiene el mayor error en la pendiente de la recta.

Analizando sus parámetros catalíticos se encontró que la velocidad de recambio ( $K_{cat}$ ) decreció, este efecto fue más drástico en la mutante monomérica L2 que disminuyó alrededor de 2.6 veces con respecto a la enzima silvestre, en la mutante L1, este valor disminuyó 1.66 veces respecto a la enzima silvestre (tabla 7). Sin embargo, se observó un incremento en la eficiencia catalítica ( $K_{cat}/K_m$ ) con respecto a la enzima silvestre en ambas mutantes (tabla 7) esto es debido a que la  $K_m$  disminuyó cerca de tres veces. La disminución de la  $K_m$  pudiera explicarse por un efecto debido a un reacomodo de los aminoácidos que contactan a la penicilina G como consecuencia de la monomerización de la proteína, lo cual es permitido en la estructura de la penicilino acilasa por la facilidad que tiene de adoptar diferentes posiciones energéticamente favorables para acomodar una variedad de compuestos en el sitio activo (Done S., et al, 1998; McDonough M. et al, 1999).

### **¿Existe un efecto de intoxicación en la bacteria por la presencia de penicilino acilasa en forma monomérica?**

Debido al efecto de mortandad observado cuando las bibliotecas se inducen con IPTG (estrategia 2), a la delección del gen de diferentes vectores, la aparición de genes truncados sin someter a selección, los problemas de expresión en un promotor débil y en un promotor fuerte como el de fago T7, creemos que puede existir un efecto de intoxicación en las bacterias provocado por las proteínas monoméricas y como consecuencia una preselección de la cepa de *E. coli* por aquellas que le son menos tóxicas.

Este posible efecto pudiera explicarse por dos hipótesis. En la primera hipótesis el efecto de intoxicación sería debido problemas de translocación, de plegamiento o una inestabilidad estructural como consecuencia de la monomerización. En la segunda hipótesis, la enzima monomérica tendría la capacidad de ser activa en el citoplasma de la bacteria.

Para apoyar la primera hipótesis se pueden considerar los problemas de translocación de la penicilino acilasa silvestre observados en este trabajo (figura 25) y en estudios previos en donde se observó la acumulación del precursor en el citoplasma de la bacteria y del dominio B y del dominio A unido al endopéptido en el periplasma tanto en forma soluble como en cuerpos de inclusión (Sizmann D. et al, 1990; Keilmann C. et al,1993; Sriubolmas N. et al,1997; Ignatova Z. et al, 2000).

Los bajos niveles de proteínas monoméricas observados en este trabajo (figura 27) podrían ser consecuencia de la ineficiente translocación hacia el espacio periplásmico, ocasionando que estas proteínas sean susceptibles de proteasas, el evento de degradación en la penicilino acilasa se ha observado que es muy rápido y en cuestión de 6 a 30 min el 90% del precursor es perdido por proteólisis intracelular.

Otro punto que no debe perderse de vista, es la construcción de las enzimas monoméricas, el donde el gen de la penicilino acilasa fue permutado circularmente y aunque se sabe que el orden de la estructura secundaria en una proteína permutada circularmente, no afecta la estructura tridimensional, en algunos casos se ve afectada la cinética de su plegamiento (Viguera A, 1995) aunado a esto, en la conformación adecuada de la penicilino acilasa, es necesario que el dominio A se pliegue primero para servir de base en el plegado del dominio B (Lindsay Ch. et al, 1991). En las mutantes monoméricas primero se sintetiza el dominio B y posteriormente el dominio A, lo que puede causar que se afecte la cinética de plegamiento, lo cual ocasionaría que las proteínas monoméricas fueran susceptibles de degradación para ser eliminadas y en este evento la bacteria se vea afectada por el gasto energético intrínscico a la maquinaria de degradación (Gottesman S. et al,1997).

En la segunda hipótesis, la presencia de actividad de acilasa de las proteínas podrían afectar la viabilidad de la bacteria; para apoyar está hipótesis se puede considerar la fuerte regulación del gen de la penicilino acilasa en la cepa original de donde se aisló (Merino, et al 1992; Roa et al 1999; Valle F. et al,1991; Sizman et al, 1990), así como la presencia de endopéptido del cual no se tiene una idea clara de su función, de la semejanza con el mecanismo de reacción de las serin proteasas o que la actividad de penicilino acilasa se ha utilizado en algunos procesos que se pueden llevar a cabo en el interior de la célula como son la síntesis de péptidos (Bossi A et al,1998), la hidrólisis y formación de enlaces amidos *in vitro* (Luuk M. et al,1999; Bruggink A. et al,1998; Murza A. et al,2000) e *in vivo* (Lu J.Y. et al, 1999) y de su capacidad autocatalítica (Brannigan J.A. et al, 1995;Kasche R. et al,1999).

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Con respecto a las proteínas monoméricas, en primera instancia se puede suponer que no son activas en citoplasma por la presencia del péptido señal, que interferiría entre la serina catalítica y el sustrato, sin embargo considerando las características catalíticas de esta enzima se puede sugerir una autoexcisión del péptido señal, o a poder llevar a cabo su catálisis dentro del citoplasma con todo y péptido señal. Sin embargo, adecuado plegamiento de estas enzimas en citoplasma sería el siguiente obstáculo a salvar. La enzima cefalosporino acilasa puede plegarse en citoplasma y presentar actividad en la misma magnitud que la de tipo periplásmico (Li Y. et al, 1999), esta enzima presenta una alta homología a nivel de estructura primaria y terciaria con la penicilino acilasa y en su mecanismo de maduración también se haya involucrada una serina nucleófila, aunado a esto se ha logrado restituir en un 62.5% la actividad en el citoplasma de la bacteria cuando se han expresado por separado las dos subunidades de la penicilino acilasa (Burtscher H. et al, 1992).

Como ya se mencionó en la introducción, la penicilino acilasa es un buen catalizador en reacciones de acilación y en este sentido, dentro del citoplasma de la bacteria podría acilar componentes útiles para la sobrevivencia de la misma. Los bajos niveles de expresión de enzima monoméricas (más activas) pudieran deberse a que la célula de alguna manera se ve afectada por esta actividad y puede utilizar mecanismos alternos para mantener solo pequeñas cantidades de la enzima monomérica que no afecten su viabilidad.

Por otro lado, la frecuencia de glicinas en el conector de las mutantes encontradas sin selección de actividad, así como en las cepas de selección, pudieran ser el resultado de la preselección por la bacteria de aquellas menos tóxicas de entre toda la población generada en la estrategia mutagénica. Ellas pudieran permitir un reacomodo a nivel estructural en las proteínas monoméricas que les permita ser más solubles o menos activas que otras mutantes no viables para la bacteria.

Finalmente, queda en el aire la pregunta ¿Cuál es la función del endopéptido?.

Hasta el momento, no se ha encontrado alguna función específica para él, sin embargo podemos sugerir dos alternativas para su función.

En la primera alternativa, el endopéptido interferiría el plegamiento de la proteína dentro del citoplasma. Si fuera posible que se formaran intermediarios plegados, estos no podrían translocarse al espacio periplásmico, porque primero tendrían que volver a un estado desnaturalizado, lo cual conlleva un gasto energético extra para la bacteria por las chaperonas dependientes de ATP involucradas en este proceso (Gottesman S. et al, 1997).

En la segunda alternativa el endopéptido impediría que la actividad de acilasa de la proteína éste presente en el citoplasma de la bacteria, para no causar un efecto negativo que ponga en riesgo su sobrevivencia, como en el caso de algunas proteínas que también sufren proteólisis para poder ser activas una vez que se encuentran en el sitio adecuado para su función biológica, de esta manera se previene el daño generalizado en la célula.

Dentro de los ejemplos de proteínas que sufren proteólisis para ser activas son enzimas digestivas y proteasas (Neurath, 1984), hormonas (Docherty, 1982), neuropéptidos (Lynch, 1986), proteínas que participan en la coagulación de la sangre (Creighton, 1993) y ensamble de algunos virus (Hellen, 1989).

## CONCLUSIONES

- Con la permutación circular del gen de la penicilino acilasa, mediante técnicas mutagénicas, fue posible la biosíntesis a 37 °C de enzimas catalíticamente activas, independientes del mecanismo post-traducciona (excisión del endopéptido).
- Se cuenta con dos cepas de *Escherichia coli* que permiten la selección de actividad de penicilino acilasa.
- Se construyeron bibliotecas de mutantes del gen de la penicilino acilasa monoméricas. A partir de estas se identificaron enzimas monoméricas con actividad.
- Las enzimas monoméricas denominadas L1 y L2 mostraron mejores eficiencias catalíticas respecto a la enzima heterodímera (silvestre) debido a que tienen una mayor afinidad por penicilina G.
- Se puede inferir un efecto tóxico de la enzimas monoméricas a la cepa de *Escherichia coli*, el cual no fue esclarecido. Sin embargo, se pueden plantear dos posibles causas, la primera un efecto por problemas en la translocación o inestabilidad de la proteína y la segunda un efecto causado por la presencia citoplásmica de la actividad de acilasa de la enzima.
- La cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue no es una buena hospedera de las enzimas monoméricas.
- La enzima penicilino acilasa es un modelo dependiente de varios factores como expresión, translocación, plegamiento, estabilidad y toxicidad los cuales se deben considerar en su estudio.

## PERSPECTIVAS

- Como hasta el momento no es clara la causa de los bajos niveles de producción de las enzimas monoméricas, es necesario discernir si este efecto es debido a la actividad *per se* de la proteína que pudiera tener un efecto negativo en la bacteria o a un efecto de degradación de la proteína por causas como solubilidad, estabilidad o una combinación de ambas cosas.
- Considerando que la eficiencia catalítica de la enzima monomérica L1 es tres veces mayor respecto a la enzima silvestre, sería conveniente hacer estudios de viabilidad para ser utilizada en la producción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos. Dentro de los procesos más interesantes está el hacer CLEC (cross-linked enzyme aggregates), ya que estos se caracterizan por tener una vida media mayor y tolerancia a solventes (Cao L. et al, 2000).
- Es importante estudiar desde el punto de vista de plegamiento si la modificación de la penicilino acilasa dimerica a monomérica causa un efecto importante, que haga que las enzimas monoméricas sean susceptibles de degradación.
- Debido a los problemas de expresión de las enzimas monoméricas pudiera considerarse evolucionar alguna proteína monomérica, para obtener enzimas más estables o solubles, una vez que se compruebe que los pobres rendimientos no son por problemas de toxicidad enzimática causada por actividad.
- Es necesario contar con estudios cristalográficos de una mutante monomérica para comprender un poco más acerca de la estructura de esta enzima y en general de la superfamilia estructural Ntn-hidrolasa a la que pertenece.
- Actualmente existe una demanda creciente a nivel mundial por los antibióticos de tipo cefalosporánico. En base a características estructurales y catalíticas entre la penicilino acilasa y la cefalosporino acilasa (Kim Y. et al, 2000; Li J. et al, 1999), podría pensarse en un cambio de especificidad de la enzima penicilino acilasa monomérica hacia cefalosporina G, de esta forma se obtendrían precursores clave en la síntesis de cefalosporinas semisintéticas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano M., Blackburn J., Aguayo C. and Fersht A. 2000. Directed evolution of new catalytic activity using the  $\alpha/\beta$ -barrel scaffold. *Nature* .403:617-622.
- Aramori, I., Fukagawa, M. Tsumura M., Iwami M., Isogai T., Ono, H., Ishitani Y., Kojo H., Kohsaka M., Ueda Y and Imaka H. 1991. Cloning and nucleotide sequencing of new glutaryl 7-ACA and cephalosporin C acylase genes from *Pseudomonas* strain. *J. Ferment. Bioeng.* 72:232-243.
- Arnold F.H. and Kuchner O.1997. Directed evolution of enzyme catalysts. *TIBTECH*.15:523-530.
- Artymiuk P.J. 1995. A sting in the (N-terminal) tail. *Nat. Struct. Biol.* 2:1035-1037.
- Ay J. Hahn M., Decanniere K., Piotukh K., Borriss R. and Heinemann U. 1998. Crystal structures and properties of de novo circularly permuted 1,3-1,4  $\beta$ -glucanases. *Proteins:Struc. Func. and Genet.* 30:155-167.
- Balasingham, K, Warburton D., Dunnill P., Lilly MD. 1972. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys Acta* 276:250-256.
- Baird G., Zacharias D. and Tsien R. Y. 1999. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *PNAS*. 96:11241-11246.
- Blundell T.1994. Problems and solutions in the protein engineering towards rational design. *TIBTECH*. 12:145-148.
- Bochtler M., Ditzel L., Groll M. and Huber R.1997. Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*. *PNAS USA*. 94:6070-6074.
- Bossi A., Cretich M. and Righetti P.G. 1998. Production of D-phenylglycine from racemic (D,L)-phenylglycine via isoelectrically trapped penicillin G acylase.60:454-461.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Chem.* 72: 248-254.
- Brannigan J.A., Dodson G., Duggleby H., Moody P.C.E., Smith J.L. Tomchick D.T. and Murzin A.G. 1995. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*. 378:416-419.
- Bruggink A., Roos E. and Vroom E. 1998. Penicillin acylase in the industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Organic Process Research & Development*. 2:128-133.
- Bruns, W. Hoppe, J., Tsal H., Brning, H.J., Maywald, F. Collins, J. and Mayer , H. 1985. Structure of the penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. *J. Mol. Appl. Genet.* 3:36-44.
- Burtscher H. and Schumacher G. 1992 .Reconstitution in vivo of penicillin acylase activity from separately expressed subunits. *Eur. J. Biochem.* 205:77-83.

- Cao L., Rantwijk F., and Sheton R. A. 2000. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic Letters*. **2**:1361-1364.
- Chang A.C.Y Cohen SN 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *J. Bact.* **134** 1141-1156.
- Chem K. and Arnold F H. 1993. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *PNAS USA*. **90**:5618-5622.
- Choi K., Kim J. and Kang S. H. 1992. Effects of site directed mutations on processing and activities of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. **174**:6270-6276.
- Chothia C. Hubbard T., Brenner S., Barns H., Murzin A. 1997. Protein folds in the all  $\beta$  and all  $\alpha$  classes. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**: 597-627.
- Chou, C.P., Yu Ch., Lin W.N., Kuo B,Y and Wang, W. Ch.1999-a. Novel strategy for efficient screening and construction of host/vector system to overproduce penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.* **65**:219-226.
- Chou, C.P., Yu Ch., Tseng J.H., Lin M., Lin H.K. 1999-b. Genetic manipulation to identify limiting steps and develop strategies for high level expression of penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.* **63**:263-272.
- Chou C.P., J. H. Tseng, Kuo B.Y., Lai K.M. Lin M and Lin H.K.. 1999-c. Effect of secB chaperone on production of periplasmic penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **15**:439-445.
- Chou, C.P. Tseng J. H., Lin M. I. Lin H. K. Yu C.C. 1999-d. Manipulation of carbon assimilation with respect to expression of the *pac* gene for improving production of penicillin acylase in *Escherichia coli*. *J. Biotech.* **69**:27-38.
- Chou C. P. Wang W. C. Lin M. 2000. An approach for enhancing heterologous production of *Providencia rettgeri* penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **16**:315-318.
- Clarke J., Fersht A. 1993. Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry*. **32**:4322-4329.
- Craig R.C. and Joyce G. 1992. Randomization of genes by PCR Mutagenesis. *PCR Methods and Applications*. **2**:28-33.
- Creighton T. 1993. Proteins: Structures and molecular properties. 2da. edición, W.H. Freeman and company, New York.
- Cunningham BA, Hemperley JJ, Hopp TP and Edelman GM. 1979. Favin versus concanavalin A: circularly-permuted amino acid sequences. *PNAS USA*. **76**:3218-3222.
- Dalbey R. E. and Wickner W. 1985. Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **260**:15925-15931.

- Daumy G.O., Danley D., McColl AS, Apostolakos D. and Vinick F.J. 1985. Experimental evolution of penicillin G acylases from *Escherichia coli* and *Proteus rettgeri*. *J. Bacteriol.* **163**:1279-1281.
- del Río, G., Rodríguez, M. A., Munguía, A. A. López-Munguía, A. and Soberón, X. 1995. Mutant *Escherichia coli* Penicillin acylase with enhanced stability at alkaline pH. *Biotechnol. Bioeng.* **48**:145-148.
- Docherty K. and Steiner D. F. 1982. Post-translational proteolysis in polypeptide hormone biosynthesis. *Ann. Rev. Physiol.* **44**:625-638.
- Done S., Brannigan J.A., Moody P.C. and Hubbard R. E. 1998. Ligand induced conformational change in penicillin acylase. *J. Mol. Biol.* **284**:463-475.
- Duggleby H.L., Tolley S.P., Hill Ch., Dodson E., Dodson G., Moody P.C. 1995. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature.* **373**:264-268.
- Eder J., Wilmanns M. 1992. Protein engineering of a disulfide bond in a  $\beta/\alpha$ -barrel protein. *Biochemistry.* **32**:4437-4444.
- Eraslan A., Terzi I., Güray A and Bermek E. 1991. Purification and kinetics of penicillin G acylase from a mutant strain of *Escherichia coli* ATCC 11105. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **51**:27-40.
- Frastréz J. 1997. In vivo versus in vitro screening or selection for catalytic activity in enzymes and abzymes. *Mol. Biotechnol.* **7**:37-55.
- Frère, J.M., Nauyen-Distèche, M., Coyette, J. and Joris, B. (1992) In the Chemistry of  $\beta$ -lactams ed. Paga, M.i., pp. 148-197, Blackie, London.
- Forney L. J. ,Wong D.C.L and Ferber D.1989-a. selection of amidases with novel substrate specificities from penicillin amidase of *Escherichia coli*. *A. Env. Micro.* **55**:2250-2555.
- Forney L. J. and Wong D.C.L.1989-b. Alteration of the catalytic efficiency of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *A. Env. Micro.* **55**:2556-2560.
- Foye W. O. Principles of medicinal chemistry. Second ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pennsylvania U.S.A.
- Furganti C, Graselli P. 1986. Immobilized penicillin acylase: Application to the synthesis of the peptide aspartame. *Tetrahed. Lett.* **11**:787-792.
- Galindo E., Lagunas F., Osuna J., Soberón X. and Garcia J.L. 1998. A microbial biosensor for 6-aminopenicillanic acid. *Enz. Micro. Tech.* **23**:331-334.
- García-Valvé S., Rojas A., Palau J. and Romeu A. 1998. Circular permutants in  $\beta$ -glucosidases (Family 3) within a predicted double domain topology that includes a  $(\beta/\alpha)_8$ -barrel. *Proteins:Struct. Func. Genet.* **31**:214-223.
- Glazer A., Nikaido H. 1994. Microbial biotechnology. Ed. Freeman and company. New york. pg. 466-470.

- Graf R. and Schachman H.K.1996. Random circular permutation of genes and expressed polypeptide chains:Application of the method to the catalytic chains of aspartate transcarbamoylase. *PNAS. USA.* **93**:11591-11596.
- Graham L. D., Haggett K. D. Jennings P.A., Le Brocque D.S. and Whittaker R. G. and Brocque D. S. 1993. Random mutagenesis of the substrate binding site of a serine protease can generate enzymes with increased activities and altered primary especificities. *Biochemistry.* **32**: 6259-6258.
- Griffiths A. D. and Tawfik D. S. 2000. Man made enzymes from design to in vitro compartmentalisation. *Curr. Opin. Biotech.* **11**:338-353.
- Goldenberg D., Creighton T E.1983.Circular and circularly permuted forms of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.***165**:407-413.
- Gottesman S., Wickner S. and Maurizi M. R. 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes & Devel.* **11**:815-823.
- Hellen T. Proteolytic processing of polyproteins in the replication of RNA viruses.1989. *Biochemistry.* **28**:98881-9890.
- Hennecke J., Sebbel P. and Glockhuber R. 1999.Random circular permutation of DsbA reveals segments that are essential for protein folding and stability. *J. Mol. Biol.***286**:1197-1215.
- Hewitt L., Kasche V., Lummer R., Lewis R. J. ,Murshudov G. N., Verma C.S., Dodson G.G. and Wilson K.S., Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active site cleft. *J. Mol. Biol.* **302**:887-898.
- Hutchinson E. G. and Thornton J. M.1994. A revised set of potentials for  $\beta$ -turn formation in proteins. *Prot. Sci.* **3**:2207-2216.
- Ignatova Z., Enfors S.O. Hobbie m. Taruttis S.,Vogt C. and Kasche V. 2000. The relative importance of intracellular proteolysis and transport on the yield of the periplasmic enzyme penicillin amidase in *Escherichia coli*. *Enz. Microbiol. Tech.* **26**:165-170.
- Ishii, Y., Saito Y., Fujimura T., Isogai T., Kojo H., Yamashita M., Niwa M and Kohsaka M. 1994. A novel 7  $\beta$ -(4-carboxybutanamido)-cephalosporanic acid acylase isolated from *Pseudomonas* strain C427 and its high-level production in *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* **77**:591-597.
- Iwakura M. and Nakamura T.1998.Effects of the length of a glycine linker connecting the N- and C-termini of a circularly permuted dihydrofolate reductase. *Prot. Eng.***11**:707-713.
- Janscak P.and Bickle T. A. 1998.The DNA recognition subunit of the type IB restriction modification enzyme EcoR1 tolerates circular permutations of its polypeptide chain. *J. Mol. Biol.* **284**:937-948.
- Juarez R. Tesis de maestria en ciencias bioquímicas.2000. Regeneración enzimática de una variante monomérica de la enzima Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei* mediante mutagénesis al azar. Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México.

- Kaartinen V., Williams J.C. Tomich J., Yates J.R. Hood L. and Mononen I. 1991. Glycosaparaginase from Human leukocytes. *J. Biol. Chem.* **266**:5860-5869.
- Kasche V., Lummer K., Nurk A., Piotrachke E., Rieks A., Stoeva S. and Voelter W. 1999. Intramolecular autoproteolysis initiates the ma
- Keilmann C., Wanner G and Böck A.1993.Molecular basis of the exclusive low temperature synthesis of an enzyme in *E. coli* : penicillin acylase.**374**:983-992.
- Kinoshita, T., Tada T., Saito Y., Ishii Y., Sato A., Murata M. 2000. Crystallization and preliminary X-ray analysis of cephalosporin C acylase from *Pseudomonas sp.* Strain N176. *Acta Cryst. Section D. Biol. Crys.***D56**:458-459.
- Kim Y. Yoon K.H. Khang Y., Turley S. and Hol W. G. J. 2000. The 2.0 Å crystal structure of cephalosporin acylase. *Structure.* **8**:1059-1068.
- Know T. H., Rhee S., Lee Y. S. Park s. S. and Kim K.H. 2000. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas sp.* GK16. *J. Struct. Biol.* **131**:79-81.
- Kraut J.1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Ann. Rev. Biochem.***46**:331-58
- Lee H, Park O K and Kang H. S., 2000.Identification of a new active site for autocatalytic processing of penicillin acylase precursor in *Escherichia coli* ATCC11105. *Bioch. Biop. Res. Comm.* **272**: 199-204.
- Lee Y. S. and Park S.S. 1998. Two step autocatalytic processing of the glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase from *Pseudomonas sp.* Strain GK16. *J. Bact.* **180**:4576-4582.
- Lee Y. S. Kim H.W. and Park S. S. 2000. The role of  $\alpha$ -amino group of the N-terminal serine of  $\beta$  subunit for enzyme catalysis and autoproteolytic activation of glutaryl 7-aminocephalosporanic acid acylase. *J. Biol. Chem.* **275**:39200-39206.
- Li Y., Chen J., Jiang W., Mao X., Zhao G., Wang E. 1999.In vivo post-translational processing and subunit reconstitution of cephalosporin acylase from *Pseudomonas sp.***130. *Eur. J. Biochem.* **262**:713-719.**
- Lindqvist Y., Scheider G. 1997.Circular permutations of natural protein sequences: structural evidence. *Curr. Opi. in Struc. Biol.* **7**:422-427.
- Lindsay C.D. and Pain R. H. 1990.The folding and solution conformation of penicillin G acylase. *Eur.J. Biochem.***192**:133-141.
- Lindsay C.D. and Pain R. H. 1991. Refolding and assembly of penicillin acylase an enzyme composed of two polypeptide chains that result from proteolytic activation. *Biochemistry.* **30**:9034-9040.

- Ljubijankic G, Storici F., Glisin V. and Bruschi C.1999. Synthesis and secretion of *Providencia rettgeri* and *Escherichia coli* heterodimeric penicillin amidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **228**:225-232.
- Löwe, J., Stock D., Jap B., Zwickl, P. Baumeister W., and Huber R.1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the *Archaeon T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*. **268**:533-539.
- Luger K, Hommel U, Herold M, Hofsteenge J., Kirschner K.1989. Correct folding of circularly permuted variants of a  $\beta\alpha$  barrel enzyme in *Vivo*. *Science*. **243**:206-210.
- Luuk M. Langen V. Rantwijk F. and Sheldon R. 1999. Enzymatic synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics using penicillin-G acylase in frozen media. *FEBS. Letters*. **456**:89-92.
- Lu JY, Lowe DA, Kennedy MD and Low PS, 1999. Folate-targeted enzyme prodrug cancer therapy utilizing penicillin-V amidase and doxorubicin prodrug. *J. Drug Target*. **7**:43-53.
- Lynch D. R. and Snyder S. H. 1986. Neuropeptides: multiple molecular forms, metabolic pathways, and receptors. *Ann. Rev. Biochem.* **55**:776-799.
- Maniatis T., Fritsch E. F. and Sambrook J. 1982. Molecular cloning A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
- Matsuda, A., Matsuyama, k., Yamamot, K. Ichikawa S. and Komatsu K. I, 1987. Nucleotide sequences of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **169**: 5821-5826.
- Margolin A., Svedas V.K. and Berezin I.V. 1980. Substrate specificity of Penicillin amidase from *E. coli*. *Biochemica et Biophysica acta*. **616**:283-289.
- Matsuda, A., Toma, K. and Komatsu K.I. 1987. Nucleotide sequences of the genes for two distinct cephalosporin acylases from *Pseudomonas* strain. *J. Bacteriol.* **169**:5821-5826.
- MacGregor E. A., Jespersen H. M. and Svensson B. 1996. A circularly permuted  $\alpha$ -amylase type  $\alpha\beta$  barrel structure in glucan synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Letter*. **378**:263-266.
- McDonough M. A. Klei H. And Kelly J. 1999. Crystal structure of penicillin G acylase from the Bro1 mutant strain of *Providencia rettgeri*. *Prot. Sci.***8**:1971-1981.
- Meevootisom V. Somsuk P, Prachktan R., Flegel TW. 1983. Simple screening method for isolation of penicillin acylase producing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:1227-1229.
- Merino, E., Balbás, p., Recillas, F. Bolivar, F. 1992. Carbon regulation and the role in nature of the *Escherichia coli* penicillin acylase (pac) gene. *Mol. Microbiol.* **6**:2175-2182.
- Murby M., Uhlén M and Stahl S. 1996. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. **7**:129-136.
- Murza A., Sánchez-Cortés S., García-Ramos J.V., Guisan J.M., Alfonso C. and Rivas G.,2000. Interaction of the antitumor drug 9-aminoacridine with guaidinobenzoatase studied by spectroscopic methods: A possible tumor market probe based on the fluorescence exciplex emission. *Biochemistry*. **39**:10557-10565.

- Murzin A.G. , Brenner S.E., Hubbard T., Chotia C. 1995. Scop: a structural classification of protein database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**: 536-540.
- Neurath H. and Walsh K.A. 1976. Role of proteolytic enzymes in biological regulation. *PNAS. USA.* **73**:3825-3832.
- Oinonen C., Tikkanen R., Rouvinen J., and Peltonen L. 1995. Three dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. *Nat. Strut. Biol.* **2**:1102-1108.
- Oliver G., Valle F., Rosetti F., Gómez-Pedrozo M., Santamaría P. Gosset G. and Bolivar F. 1985. A common precursor for the two subunits of the penicillin acylase from *Escherichia coli*. *Gene.* **40**:9-14.
- Osuna ,J. Viadiu, H., FinK, A. L., Soberón, X., 1995. Substitution of Asp for Asn at position 132 in the active site of TEM  $\beta$ -lactamase. *J. Biol. Chem.* **270**:775-780.
- Pharmaceutical and Healthcare Industries, 1998. Global Information Solutions for the Pharmaceutical and Healthcare Industries. <http://www.ims-global.com>
- Pieper U., Hayakawa K., Li Zhong and Herberg O. 1997. Circularly permuted  $\beta$ -lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1. *Biochemistry.* **36**:8767-8774.
- Prieto I., Marín J., Arche R., Fernández P., Pérez-Aranda and Barbero J.L. 1990. Penicillin acylase mutants with altered site directed activity from *Kleyvera citrophila*. *App. Microb. Biotech.* **33**:553-559.
- Ponting CP and Russell RB. 1995. Swaposins: circular permutations within genes encoding saposin homologues. *Trends Biochem Sci.* **20**:179-180.
- Rees A. R. 1994. Antibody design: beyond the natural limits. *Trends Biotechnol.* **12**:199-206.
- Riaño L, 2000. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Desarrollo de un sistema de selección para la actividad de aldolasa. Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México.
- Roa A. and García J.L. 1999. New insights into the regulation of the pac gene from *Escherichia coli* W ATCC 11105. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**:7-14
- Scott N. and Aust S. D. 2000. Engineering a disulfide bond in recombinant manganese peroxisase results in increased thermostability. *Biotechnol. Prog.* **16**:326-333.
- Schumacher G., Sizmann D., Buckel P., Haug H., Bock A. 1986. Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene protein relation. *Nucleic Acids Reserch* **14**:5713-5727
- Slade A., Horrocks A.J., Lindsay C.D. Dunbar B. and Virden R. 1991. Site directed chemical conversion of serine to cystein in penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. *Eur. J. Biochem.* **197**:75-80.
- Savidge T.A. and Cole M. 1975. Antibiotic inactivation and modification. *Meth. Enzym.* **43**:705-725.

- Scherrer, S. Rodas, N., Zouheiry H., Branlant G., 1994. Periplasmic aggregation limits the proteolytic maturation of the *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**:85-91.
- Shewale, J. G. and Sivaraman, 1989. Penicillin acylase: enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. *Process Biochem.* **24**:146-154.
- Sizmann, D., Kleilmann C. and Bock, A. 1990. Primary structure requirements for the maturation in vivo of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *FEBS. Eur. J. Biochem.* **192**:143-151.
- Sleipe, B. 1999. Evolutionary approaches to protein engineering. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **243**:55-86.
- Smith, J. L. Zaluzec E.J. Wery J-P, Niu L., Switzer R.L. Zalkin H. and Satou Y. 1994. structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science.* **264**:1427-1433.
- Sriubolbas N, Panbangred W, Sriurairatana S and Meevootisom V, 1997. Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:373-378.
- Stemmer, W. P. 1994-a. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 10747-10751.
- Stemmer, W.P. 1994-b. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature.* **370**: 389-391.
- Sundberg S. A. 2000. High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution and cell based approaches. *Curr. Opi. Biotech.* **11**:47-53.
- Suresh C.G. Pundle A.V. Sivaraman H., Rao K.N. Brannigan J.A., McVey C.E., Verma C.S., Dauter Z., Dodson E.J. and Dodson G.G. 1999. Penicillin V acylase crystal structure reveals new Ntn-hydrolase family members. *Nat. Struct. Biol.* **6**:414-416.
- Suzuki H, Kumagai H., Echigo T., Tochikura T. 1989. DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase gene. *J. Bact.* **171**:5169-5172.
- Travis J. 1994. Reviving the antibiotic miracle? *Science.* **264**:360-362.
- Vandamme E. J. 1981 in Economic microbiology vol. 5, (Rose A. H.), pag. 467-522 Academic Press.
- Valle F., Balbás P., Merino E. and Bolivar F. 1991. The role of penicillin amidases in nature and in industry. *TIBS.* **16**: 36-40.
- Verhaert R. D., Duin J.V. and Quax W. J. 1999. Processing and functional display of the 86 kDa heterodimeric penicillin G acylase on the surface of phage fd. **342**:415-422.
- Viguera A. R. Blanco F.J. and Serrano L. 1995. The order of secondary structure elements does not determine the structure of a protein but does affect its folding kinetics. *J. Mol. Biol.* **247**:670-681.

- Voigt Ch, Gordon D.B. Mayo S.L. 2000. Trading accuracy for speed: A quantitative comparison of search algorithms in protein sequence design. *J. Mol. Biol.* **299**:789-803.
- Walsh Ch. 2001. Enabling the chemistry of life. *Nature.* **409**:226-231.
- Wieligmann K., Norledge B., Jaenicke R. and Mayr E.M.1998. Eye lens  $\beta$ 2 crystallin: circular permutation does not influence the oligomerization state but enhances the conformational stability. *J. Mol. Biol.* **280**:721-729.
- Zhang Ch., Kim SH.,2000. The anatomy of protein  $\beta$ -sheet topology. *J. Mol. Biol.* **299**:1075-1089.
- Zhao H, Arnold F. 1997-a. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Research.* **25**:1307-1308.
- Zhao, H. Giver Lori, Shao Z. Affholter J. Arnold F.1998. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotech.* **16**:258-261.