

00551

3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



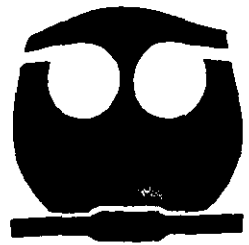
DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS
FACULTAD DE QUIMICA

299638

EVOLUCION MOLECULAR ACELERADA EN LA
SUPERFAMILIA DE LAS HIDROLASAS
DEPENDIENTES DE METAL.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO ^{Bioquimicas} EN CIENCIAS
P R E S E N T A
BIOL. LUIS BRISEÑO ROA

ASESOR: DRA. MYRIAM M. ALTAMIRANO BUSTAMANTE



MEXICO, D. F.,

2001.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Evolución Molecular Acelerada en la
Superfamilia de las Hidrolasas
Dependientes de Metal

•

Biólogo Luis Briseño Roa

Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Of. No. PMDCB/160/2001

BIOL. LUIS BRISEÑO ROA
Alumno de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 22 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "Evolución molecular acelerada de hidrolasas dependientes de metal", dirigida por la Dra. Myriam Altamirano Bustamante.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Eduardo Bárzana García
VOCAL	Dr. Eduardo Horjales Reboredo
SECRETARIO	Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero
SUPLENTE	Dra. Adela Rodríguez Romero
SUPLENTE	Dr. Ruy Pérez Montfort

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de febrero del 2001.
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA

Amelia Farrés González-Saravia
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo

AFGS*1gg.



AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue posible gracias al apoyo de CONACYT, a través del programa de Becas para Estudiantes de Posgrado Nacional y de la Dirección General de Estudios de Posgrado por el Complemento de Beca de Posgrado.

Debo agradecer al Profesor Alan Fersht por el apoyo y la invitación, una vez más, para formar parte del equipo de trabajo del Centro de Ingeniería de Proteínas, Cambridge, UK, donde se realizó este trabajo.

Al Dr. Dan Tawfik y al Dr. Andrew Griffiths por su paciente colaboración en este proyecto.

Quisiera agradecer también a Tobias Janowitz, Richard Weinberg, Zoryana Oliynic, Pia Soldenbërg y Nuria Sánchez-Puig por el apoyo y las enriquecedoras discusiones. Ellos son los mejores compañeros de laboratorio que se pueda tener.

A todos mis profesores y compañeros con quien compartí las clases durante los cursos del programa de maestría.

Un agradecimiento muy especial para Leticia García, Ana María Obregón y la Dra. Amelia Farrés de la Coordinación del Posgrado en Ciencias Bioquímicas, por su beligerancia y apoyo incondicional.

A la comunidad de Westland Terrace # 5: Omar, Carlos y José Antonio, con quienes tuve la inolvidable experiencia de cohabitar. A Thomas Hertog por las reveladoras y excitantes charlas. A Juan V. Escobar por ayudarme a entender lo esencial que es contar con sentido del humor.

A la familia Von Taxi, el Querubín y el Berimbao, por abrirme los ojos al mundo a través del corazón de los buenos amigos.

A mis padres Luis y Cristina por su apoyo amoroso, constante e incondicional. A mi querida y sorprendente hermana Julieta de quién no dejo de aprender. A mi tía Marcela por todo su cariño.

A Bárbara, quién con su amor y respeto me ha enseñado a mirar.

Debo agradecerle a la Dra. Myriam Altamirano por permitirme seguir aprendiendo bajo su tutela, y con quien espero de todo corazón, queden muchos años de trabajo juntos por delante.

A Myriam y Mario,
con todo mi cariño.

A Gloria Roa,
Fernando González
y Luis Roa.

Nada en la biología tiene sentido
si no es visto bajo la luz de la evolución.

Theodosius Dobzhansky, 1973

CONTENIDO

Resumen	7
Capítulo I: Introducción	9
Evolución molecular acelerada	9
Generación de variación	11
Barajeo de genes	13
PCR StEP	14
Diversidad dirigida <i>in vitro</i>	15
Sistemas de selección	16
La superfamilia de las hidrolasas dependientes de metal	18
La fosfotriesterasa (PTE)	20
Mecanismo catalítico y sitio de unión al sustrato en la PTE	23
Proteínas homólogas a la PTE	25
PTE vs. ePHP	26
Capítulo II: Antecedentes	28
Evolución dirigida en barriles α/β	28
Clasificación general de los barriles α/β	29
Hipótesis	30
Objetivo general	31
Objetivos particulares	31
Capítulo III: Resultados	33
Determinación de tipo de asas	33
Fosfotriesterasa (PTE)	33
Proteína homóloga a la fosfotriesterasa de <i>Escherichia coli</i> (ePHP)	36
Proteína homóloga a la fosfotriesterasa de humano (hPTER)	37
Construcción de híbridos	38
ePHP + PTE = ePHP(PTE)	41
hPTER + PTE = hPTER(PTE)	46
ePHP + IGPS = ePHP(PTE)	48
Secuencias de los genes híbridos	48
Clonación y sobreexpresión	50
Diversidad dirigida en las asas P1 y P2	52
Diseño de oligonucleótidos degenerados	52
Inserción de oligos mediante barajeo de genes	54
Inserción de oligos mediante PCR StEP con fragmentos digeridos	57
Inserción de oligos mediante PCR StEP	58
Inserción de diversidad durante construcción	60
Sistemas de selección	61
Selección <i>in vivo</i>	62
Tamizado <i>in vivo</i>	63
Selección <i>in vitro</i>	65

Capítulo IV: Discusión y conclusiones	67
Construcción de los híbridos ePHP(PTE) y hPTEr(PTE)	67
Diversidad dirigida	68
Sistemas de selección	69
Perspectivas	69
Modificación de selectividad	70
Bioacumulación	71
Las paraoxonasas en suero humano	72
Capítulo V: Material y Método	73
Apéndice	87
Tabla de abreviaturas	88
Referencias	89

RESUMEN

La evolución molecular acelerada consiste en imitar en el laboratorio el algoritmo evolutivo de variación y selección, empleado en la naturaleza. Esta estrategia, que ha permitido crear nuevas características enzimáticas antes inalcanzables por métodos convencionales de diseño racional, al ser combinada con análisis estructurales permitió recrear la evolución divergente en dos enzimas de la biosíntesis del triptófano.

Las superfamilias agrupan proteínas que poseen bajo porcentaje de identidad a nivel de secuencia pero elevadas congruencias estructurales. En el caso de la superfamilia de las hidrolasas dependientes de metal, éstas poseen un plegamiento de barril α/β y catalizan una variedad de reacciones de hidrólisis de amidas, ureas y fosfotriésteres, empleando iones metálicos en sus sitio activo. Dentro de esta superfamilia se encuentran, entre otras, la fosfotriesterasa de *Pseudomonas diminuta*, la adenosina deaminasa de *Mus musculus* y la ureasa de *Klebsiella áerogenes*.

La fosfotriesterasa (PTE) fue aislada de las bacterias de vida libre *Pseudomonas diminuta* y *Flavobacterium sp* (ATCC 27551) encontradas en suelos contaminados con insecticidas organofosforados. Esta enzima es capaz de hidrolizar diversos compuestos organofosforados empleados como pesticidas, gases nerviosos o agentes de guerra química. Entre estos compuestos se distingue el paraoxón (dietil *p*-nitrofenil fosfato), ya que es hidrolizado con una eficiencia cercana al límite impuesto por la difusión ($k_{cat}/K_m = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a pesar de que fue sintetizado por primera vez hace menos de 50 años.

Se han encontrado proteínas homólogas a la PTE en *Escherichia coli* (ePHP) y en humanos (hPTE) carentes de actividad de fosfotriesterasa. Éstas proteínas comparten 28% y 27% de identidad respectivamente en su secuencia con la PTE (31% entre ambas). A pesar de esta baja identidad, existe tan sólo una desviación rms de 1.7 Å entre la mayor parte de los carbonos

alfa de la PTE y la ePHP. Las regiones que presentan una mayor desviación son las asas que unen el extremo carboxilo de las β -plegadas con las α -hélices que las proceden.

El objetivo del presente trabajo es conferir actividad de fosfotriesterasa a la ePHP y a la hPTER, mediante la estrategia de diseño racional/evolución acelerada, propuesta por Altamirano y colaboradores (2000a). En la primera parte del trabajo, se realizó un análisis de las estructuras de la PTE, ePHP y hPTER, del cual se determinó que en las asas $\beta 7 \alpha 7$ (P1) y $\beta 8 \alpha 8$ (P2) de la PTE se encuentran la mayoría de los residuos directamente involucrados en la unión del sustrato. Estas regiones se transfirieron de la PTE a la ePHP y la hPTER, generando así los híbridos ePHP(PTE) y hPTER(PTE).

Un factor importante en los experimentos de evolución acelerada es el constar con un método de selección que permite identificar las clonas con la actividad de interés. Por ello, se estudiaron algunos posibles sistemas de selección para la actividad de fosfotriesterasa, de los cuales se obtuvo un sistema de tamizado *in vivo* que permite encontrar mutantes hasta 10^5 veces menos activas que la PTE. Además, en colaboración con el equipo de trabajo de Griffiths y Twafik, se logró montar el sistema Genescis (Griffiths y Twafik, 1998) para la selección *in vitro* de fosfotriesterasas.

Los híbridos ePHP(PTE) y hPTER(PTE) se sometieron al tamizado *in vivo*, pero no se les registró actividad alguna, por lo que su eficiencia catalítica debe de ser por lo menos 10^5 veces menor a la PTE.

Como parte de la estrategia de evolución acelerada, se diseñaron oligonucleótidos degenerados con el fin de crear una biblioteca con la diversidad dirigida en las asas P1 y P2. Se siguieron diferentes estrategias de recombinación *in vitro* para crear las bibliotecas con diversidad dirigida, sin embargo, por ninguna de ellas fue posible la construcción de dichas bibliotecas. Aun cuando el objetivo general del trabajo no se cumplió cabalmente, se lograron avances importantes en el establecimiento de los sistemas de selección y construcción de los híbridos ePHP(PTE) y hPTER(PTE).

Capítulo I: Introducción

A mediados del siglo XIX Charles Darwin propuso que el principal mecanismo de evolución es la selección natural (Darwin, 1859). Aun cuando Darwin admitió tener una profunda ignorancia sobre las leyes de la variación, comprendió que un cambio evolutivo es un proceso de dos etapas complementarias: la producción de variación y el tamizado de ésta mediante la selección natural (Mayr, 1991).

La primera base sólida sobre la naturaleza de la variación y su vínculo con el proceso evolutivo se debió a la conciliación de la idea de evolución por selección natural con la genética Mendeliana (redescubierta medio siglo después de la publicación de *El Origen de las Especies*). Esta síntesis, producto del trabajo independiente de R. A. Fisher, J. B. S. Haldane y S. Wright, dio origen a *la teoría sintética de la evolución o neo-Darwinismo* (Ridley, 1996). El conocimiento subsecuente de las bases moleculares de la genética, representado por el modelo de Watson y Crick sobre la estructura básica del DNA, ha permitido comprender a fondo el origen de la variación enunciada en un principio por Darwin.

Actualmente, el panorama de la evolución molecular se entiende en el contexto de *la teoría de evolución por selección natural* complementada por *la teoría neutral de la evolución* propuesta por Kimura (1968) y King y Jukes (1969). A pesar de que estas dos teorías constituyen un paradigma sólido para comprender la evolución a nivel molecular, no son suficientes para entender cabalmente los mecanismos evolutivos presentes en la naturaleza (Ohta, 2000).

Evolución molecular acelerada

Las enzimas modernas, cuyas características son el resultado de millones de años de evolución, constituyen un exquisito ejemplo del poder del algoritmo evolutivo empleado en la naturaleza.

Parte de esta extraordinaria adaptación a nivel molecular puede verse en el amplio espectro de temperaturas óptimas (de 0° C a más de 90° C) en las cuales las enzimas modernas trabajan (Jaenicke y Böhm, 1998; Feeler y Gerday, 1997). Algunas de estas enzimas son capaces de sobrepasar barreras de energía libre de más de 24 kcal/mol y de acelerar reacciones hasta en 17 órdenes de magnitud (Griffiths y Tawfik, 2000). Dado que estas características han dependido de una contingencia histórica de deriva génica y de adaptación a presiones de selección en un ambiente celular (también restringido en el caso de los metazoarios a la sobrevivencia del organismo), las enzimas naturales rara vez pueden ser empleadas directamente con fines comerciales. Debido a esto, el rediseño de las enzimas modernas, más que la creación de enzimas *de novo*, ha sido la estrategia principal para poder emplear estos biocatalizadores con fines biotecnológicos.

La modificación racional de enzimas mediante el empleo de información estructural ha tenido cierto éxito en el rediseño de enzimas (Shao y Arnold, 1996; Hellinga 1997; Hellinga 1998; Bassil *et al*, 1997). Sin embargo, esta estrategia requiere de una gran cantidad de información – a menudo no disponible – y de un elevado poder computacional para procesarla. En general, el problema de traducir la información estructural en actividad biológica por medio de diseños racionales es, en la actualidad, casi insuperable (Griffiths y Tawfik, 2000).

En los últimos años, el diseño combinatorio ha surgido como una poderosa alternativa al diseño racional (Arnold, 1998a; Kauffman y Ellington, 1999). Esta metodología, conocida como *evolución acelerada* o *evolución dirigida*, emula *in vitro* el algoritmo genético de variación y selección. Las técnicas de evolución *in vitro* permiten construir bibliotecas de hasta 10^{15} genes y de buscar en ellas, por medio de un sistema de selección o tamizado, alguna característica determinada. A diferencia de la selección natural donde múltiples fuerzas ambientales determinan la dirección de la evolución, en los experimentos de evolución *in vitro* las presiones de

selección son más específicas, por lo que es posible crear rápidamente variantes con características especializadas (Patter *et al*, 1997).

La domesticación de proteínas mediante la evolución dirigida permite (1) la creación de variantes de proteínas naturales, que son respuestas instructivas a determinados retos bioquímicos y ambientales; (2) revelar algunos de los mecanismos que se encuentren en la evolución molecular en la naturaleza; (3) resolver preguntas sobre la compleja relación que existe entre la estructura y la función de las proteínas; y (4) explorar funciones de enzimas que nunca han sido requeridas en el ambiente natural, de las cuales los procesos moleculares son relativamente desconocidos (Arnold, 2000).

Empleando la evolución dirigida en la modificación de enzimas ha sido posible obtener mayor actividad en condiciones extremas de temperatura, pH, en presencia de solventes orgánicos o agentes alquilantes, mayor afinidad por compuestos no hallados en la naturaleza, refinamiento en la enantioselectividad y modificación de algunas características generales que posean los genes parentales (Tobin *et al*, 2000).

Varias revisiones se han publicado recientemente (Arnold 1998; Giver y Arnold, 1998b; Harayama, 1998; Minshull y Stemmer, 1999; Steipe, 1999; Tobin *et al*, 2000), incluyendo aquellos enfocados a la evolución de biocatalizadores y química de procesos (Arnold y Volvok, 1997; Bornscheuer, 1998; Kuchner y Arnold, 1997; Marrs *et al*, 1999), terapia génica (Encell *et al*, 1999; Stemmer y Soong, 1999) y farmacéuticos y vacunas (Patten *et al*, 1997).

Generación de variación

La variación en las poblaciones con reproducción asexual, en un ambiente favorable, se debe generalmente a mutaciones puntuales producto de errores en la replicación. Por otro lado, en poblaciones con reproducción sexual, la recombinación es la fuente principal de diversidad molecular. La recombinación homóloga es un proceso que ha aparecido en más de una

ocasión durante la historia evolutiva: existe recombinación en algunos virus (Kuwata *et al*, 1997), en células procariontes (Habber, 1999) y en el sistema inmune de vertebrados (Tonegawa, 1983; Reynaud *et al*, 1999).

La generación de variación mediante recombinación permite un proceso de adaptación y evolución mucho más eficiente si se le compara con aquel dependiente de mutaciones aleatorias (Crameri *et al*, 1998). Esto se debe a que la recombinación permite el intercambio de información previamente seleccionada, y la eliminación del "ruido" producto de la acumulación de mutaciones neutrales (o casi neutrales) cuya acción conjunta es deletérea para la función (Müller, 1964).

En experimentos de evolución dirigida, se han empleado técnicas que imitan *in vitro* la mutagénesis aleatoria y la recombinación homóloga. Ejemplos de las técnicas que imitan los mecanismos detrás de la creación de variación en organismos de reproducción asexual son la PCR mutagénica, que emplea polimerasas con baja fidelidad para introducir mutaciones puntuales al azar en cada ciclo de amplificación (Cadwell y Joyce, 1992); la mutagénesis dirigida repetitiva (Reidhaar-Olson *et al*, 1991); y la mutagénesis química

El beneficio de la recombinación, el cual justifica "el costo ecológico doble del sexo"¹ (Laurence, 1996; West *et al*, 1999), puede ser imitado *in vitro* mediante las técnicas de barajeo de genes (Stemmer, 1994a; Stemmer 1994b) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) StEP (*Staggered Extension Process*; Zhao *et al*, 1998).

¹ "el costo doble del sexo" hace referencia a que organismos con reproducción asexual potencialmente aportan el doble de descendencia en comparación con aquellas con reproducción sexual.

Barajeo de genes

En 1994, Stemmer introdujo el método de barajeo de genes (*DNA shuffling*) o PCR sexual para la formación de genes recombinantes (Stemmer, 1994a; Stemmer 1994b) a partir de un juego de genes originales (figura 1). En el primer paso de este método, una población de genes (fig. 1a) son fragmentados al azar. Esto produce fragmentos de varios tamaños (fig. 1b) que, después de la desnaturalización se hibridizan formando una mezcla homogénea de fragmentos excedentes en 5' y 3' (fig. 1c). Empleando la PCR, estos fragmentos se extienden en el extremo 5', dejando el 3' intacto, aumentando el tamaño promedio de fragmento en cada ciclo de la reacción (fig. 1d). Los genes ensamblados son posteriormente amplificados empleando cebadores que reconocen los extremos del gen (fig. 1e). La recombinación ocurre cuando fragmentos derivados de una secuencia original sirven como cebadores de otra diferente.

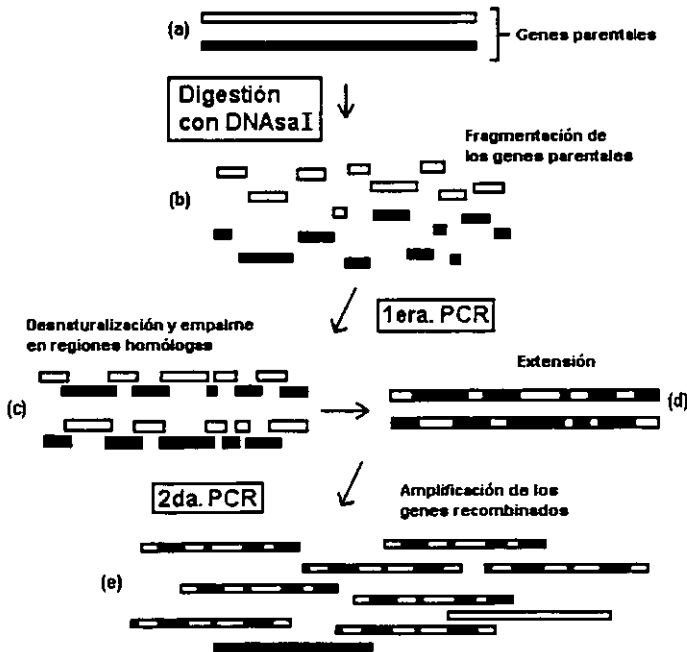


Figura 1. Recombinación homóloga *in vitro* mediante barajeo de genes o PCR sexual.

En esta técnica el número de genes originales puede variar, a diferencia de la recombinación natural donde siempre son un par. De hecho, se ha observado que emplear varios genes originales permite combinar una mayor cantidad de mutaciones benéficas en un solo gen (Crameri *et al*, 1999). Por otro lado, cuando se emplea en el barajeo de genes una sola secuencia original, solamente se introducen mutaciones aleatorias debido a la reacción de la polimerasa. Sin embargo, y a diferencia de la PCR mutagénica que no permite amplificar fragmentos mayores a 1 kb, el barajeo de genes puede ser aplicado a secuencias mayores a 1 kb (Caldwell y Joyce, 1992).

PCR StEP

Otro método que permite la recombinación homóloga *in vitro* es la StEP PCR (Zhao *et al*, 1998). La PCR StEP está basada en un reacción ordinaria de PCR pero con tiempos de empalme y extensión muy cortos (figura 2).

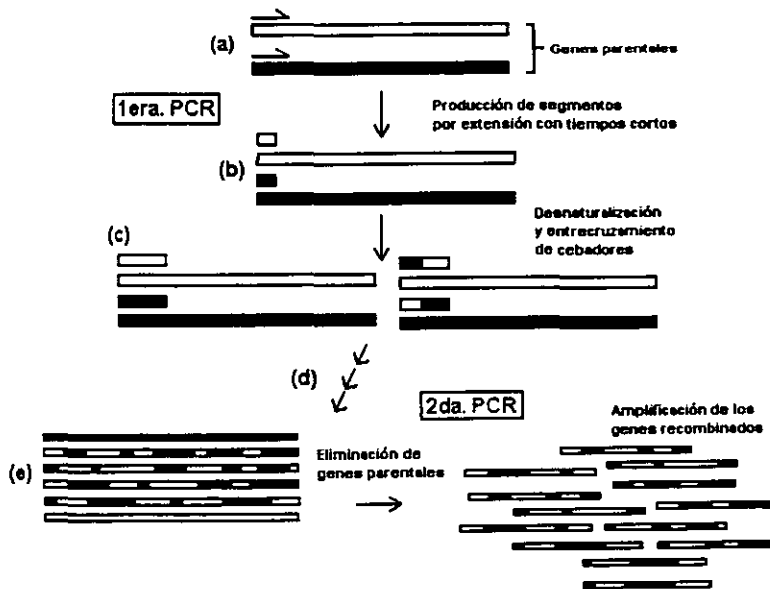


Figura 2. Recombinación génica mediante la PCR StEP

Los ciclos cortos terminan prematuramente la extensión de los cebadores (fig. 2b), produciendo segmentos truncados que se empalman al azar con los genes originales en el siguiente ciclo (fig. 2c), creando así secuencias recombinantes (fig. e). Después de la eliminación de los genes originales, se emplea una segunda reacción de PCR para la amplificación de los genes recombinantes.

Este método ofrece la ventaja sobre el barajeo de genes en que no hay necesidad de digerir ni reensamblar los genes, procedimiento que a menudo presenta dificultades técnicas. Las condiciones óptimas dependen de la composición de las bases y del grado de recombinación deseado.

Diversidad dirigida *in vitro*

La evolución molecular acelerada está lejos de ser la panacea de la ingeniería de proteínas, ya que ésta depende, entre otros factores, de la disponibilidad de un sistema de selección – o tamizado – eficiente. Debido a esto, se ha propuesto una estrategia combinada de diseño racional y evolución dirigida que enfoca la búsqueda de la actividad deseada (Altamirano *et al*, 2000). Dicha estrategia consiste en restringir el espacio de búsqueda de la evolución dirigida empleando la información estructural disponible, y determinando que regiones en la estructura terciaria de las proteínas han sido conservadas a lo largo de la evolución. Esta restricción se complementa con el uso de oligonucleótidos degenerados (Reidhaar-Olson *et al*, 1991) en el barajeo de genes (Cramer *et al*, 1996; Altamirano *et al*, 2000), aumentando la diversidad de la librerías en sitios específicos.

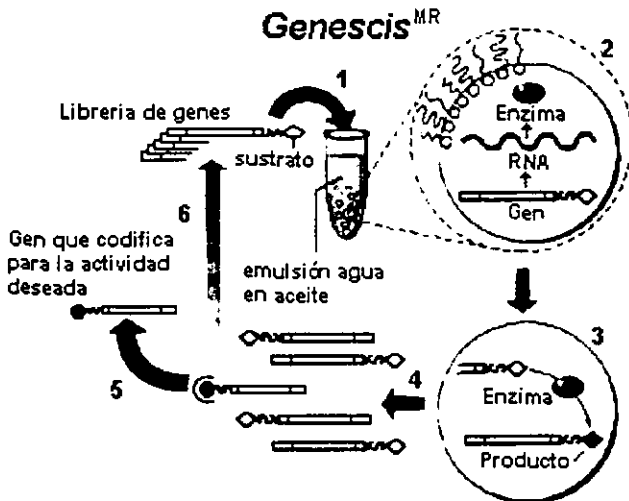
En cierta medida, el diseño racional imprime dirección en la variación, contribuyendo así a una mayor especificidad y direccionalidad en el proceso evolutivo *in vitro*. En general, no se acepta que exista dicha direccionalidad en la variación en la naturaleza, ya que se cree que el origen de la variación genética es independiente del medio (Lenski y Mittler, 1993; Jablonka *et al*, 1998).

Sistemas de selección

El factor limitante en los experimentos de evolución dirigida es el contar con un método de selección que permita aislar, de la biblioteca generada por los métodos de variación, el gen cuyo producto polipeptídico tenga las características requeridas. Buena parte del éxito que ha tenido la evolución dirigida en el diseño de proteínas se debe a los sistemas de selección empleados.

Los métodos de selección permiten expresar la carga genotípica en términos fenotípicos; es decir, asocian a los genes con sus productos polipeptídicos. Esta unión debe ser compartimentalizada, es decir, debe existir una relación biunívoca entre el gen y su producto polipeptídico. Una clasificación general de los sistemas de selección depende de si dicha compartimentación se lleva a cabo *in vivo* o *in vitro*.

Los sistemas clásicos de selección *in vivo* consisten en la clonación de las bibliotecas en un organismo hospedero donde se complementa una función que el organismo no posea, neutralización de una sustancia tóxica para el organismo, o proveyendo una sustancia esencial para el crecimiento. Los métodos de selección *in vivo* están restringidos por (1) la eficiencia de la clonación (10^6 - 10^8); (2) dado que la reacción se lleva dentro de un organismo, se restringe el espectro de reacciones, de sustratos, o bien la propiedad que se busca existe previamente en el ambiente celular o la célula encuentra vías alternativas para generar el fenotipo seleccionado (por ejemplo, incrementado sobreexpresión). Una clase especial de "selección" es el tamizado *in vivo*, donde clonas individuales son seleccionadas a mano (o por medio de un robot) para después ser sometidas a un ensayo de actividad. En general por este método pueden examinarse entre 10^2 y 10^6 variantes (Griffiths y Tawfik, 1998).



Griffiths y Tawfik (1998). *Nat Biotechnol*, **16**:652-656.

Figura 3. Selección de genes por compartimentación *in vitro* (*Genescis*)

La compartimentación *in vitro* esta representada por el sistema *Genescis* (figura 3; Griffiths y Tawfik, 1998) en el cual (1) una mezcla de transcripción/traducción *in vitro* que contenga una biblioteca de genes unidos covalentemente al sustrato se dispersa en una emulsión agua/aceite (donde generalmente queda un gen por compartimento); (2) los genes se transcriben y traducen dentro del compartimento acuoso; (3) las proteínas con actividad convierten el sustrato a producto, el cual queda unido al gen; (4) la emulsión se rompe, se detiene la reacción, y la fase acuosa se une combinando los genes unidos al producto los cuales pueden ser amplificados, caracterizados (5) o recompartmentalizados para selecciones sucesivas (6).

En el presente trabajo se estudiaron tres posibles sistemas selección: una selección *in vivo*, un tamizado *in vivo* y una selección *in vitro* por el método de *Genescis*. La descripción detallada de estos métodos se encuentra más adelante, en el capítulo III y V.

La superfamilia de hidrolasas dependientes de metal

Debido a la existencia de un número limitado de plegamientos de proteínas en la naturaleza (Dorit *et al* 1990; Chotia, 1992; Orengo *et al*, 1994) se ha propuesto que su reuso, mediante el reclutamiento de genes (adquisición de nuevas funciones en genes preexistentes) debió simplificar el proceso de evolución del metabolismo (Babbit y Gerlt, 1997).

Evidencia que apoya esta suposición es la existencia de enzimas con promiscuidad catalítica (Jeffery, 1999), las cuales podrían ser parte de un proceso incipiente de divergencia evolutiva (O'Brien y Herschlag, 1999). Como parte de este mecanismo de reclutamiento enzimático, se ha propuesto que es el mecanismo catalítico y no la especificidad de sustrato la que ha dictado la evolución de nuevas actividades enzimáticas (Petsko *et al*, 1993; Babbit y Gerlt, 1998). Reflejo de este proceso de evolución divergente es la posibilidad de clasificar en superfamilias a las proteínas: los miembros de una superfamilia comparten un mismo plegamiento y mecanismo catalítico, pero emplean diferentes sustratos (Babbit y Gerlt, 1997). A pesar del alto grado de similitud estructural, las enzimas dentro de una superfamilia pueden compartir tan solo el 10% en estructura primaria.

Los miembros de la superfamilia de las hidrolasas dependientes de metal o amidohidrolasas catalizan una variedad de reacciones de hidrólisis utilizando amidas, ureas, fosfotriésteres y triazinas (Holm y Sander, 1993; Sadowsky *et al*, 1998). Los miembros estructuralmente caracterizados son la ureasa (Jabri *et al*, 1995), la fosfotriesterasa (Benning *et al*, 1995), la proteína homóloga a la fosfotriesterasa de *Escherichia coli* (Buchbinder *et al*, 1998) y la adenosina deaminasa (Wilson y Quioco, 1993). Estas enzimas poseen una estructura de barriles α/β (figura 4; Murzin *et al*, 1995).

Fosfotriesterasa (*Pseudomonas diminuta*)



Vanhook et al (1996). *Biochemistry*, 35:6020-5

Proteína Homóloga a la Fosfotriesterasa (*Eschenchia coli*)



Buchbinder et al (1998). *Biochemistry*, 37:5096-106.

Adenosina deaminasa (*Mus musculus*)



Wilson y Quioco (1993). *Biochemistry*, 43:1689-1694.

Figura 4. Dos vistas de las estructuras cristalográficas de algunos miembros de la superfamilia de las hidrolasas dependientes de metal. Imágenes generadas por RasMol v2.7.

Alineamientos estructurales y de secuencia revelan que los miembros de esta superfamilia comparten la secuencia consenso HxH*H*H*D (donde x representa cualquier aminoácido y * fragmentos de tamaño variable), la cual describe una región del sitio activo donde uno o dos iones metálicos se unen a la estructura sirviendo como cofactores. La ureasa contiene un centro binuclear de Ni²⁺, tanto la fosfotriesterasa (PTE) como la proteína homóloga en *E. Coli* (ePHP) poseen un centro binuclear de Zn²⁺ y la adenosina deaminasa contiene un centro mononuclear de Zn²⁺. En la ureasa y la fosfotriesterasa un lisina carbamilada sirve como puente de los iones metálicos en el centro binuclear, mientras en la ePHP posee un ácido aspártico o glutámico como unión entre ambos iones. Los miembros de esta superfamilia que todavía no se encuentran caracterizados estructuralmente como AMP desaminasa, dihidroorotasa, alantoinasa, arildialquil-fosfatasa, *N*-isopropilamida isopropilamino hidrolasa, la proteína homóloga a la fosfotriesterasa en humanos, y algunas otras, poseen conservado el residuo aspártico o glutámico que emplea la ePHP en el centro bimetálico (Holm y Sander 1993; Sodowsky *et al*, 2000).

La fosfotriesterasa (PTE)

El gen que codifica para la fosfotriesterasa (PTE), llamado *opd* o *pte*, fue aislado de dos plásmidos diferentes de *Pseudomonas diminuta* MG y de *Flavobacterium sp.* (ATCC 27551) (Mulbry *et al*, 1986; Harper *et al*, 1988). El gen *opd*, que contiene un péptido líder para exportación al periplasma de 39 residuos, ha sido clonado, secuenciado (McDaniel *et al*, 1988; Mulbry y Karns, 1989) e introducido en varios organismos como posibles medios de sobreexpresión (Dumas *et al*, 1989; Phillips *et al*, 1990; Dave *et al* 1994).

La PTE activa es un homodímero cuyos monómeros, de 339 residuos y 35,000 Da de peso, presentan una estructura de barril α/β distorsionada formada por ocho β -plegadas rodeada por nueve α -hélices (Benning *et al*, 1994; Benning *et al* 1995; Vanhooke *et al*, 1996) (figura 4) (McDaniel *et al*,

1988; Mulbry y Karns, 1989). La estabilidad total del homodímero nativo en relación con los monómeros desnaturalizados ($_G_T$) fue estimada en 40 kcal/mol (la mayor reportada para una proteína dimérica) y una T_m de 75 °C (Grimsley *et al*, 1997).

La fosfotriesterasa (E.C. 8.1.3.1) es capaz de hidrolizar diversos compuestos organofosforados (figura 5a) como el paratión y paraoxón (empleados como insecticidas; Caldwell *et al*, 1991), sarín, somán, tabún, agente XV (gases nerviosos y agentes de guerra química; Dumas *et al*, 1990; Kolakowski *et al*, 1997) y análogos de CWA (Dumas *et al* 1989; Hoskin *et al*, 1995). La toxicidad de un compuesto organofosforado depende de la reactividad de su centro fosforil, el cual puede unirse e inactivar colinesterasas y otras enzimas (Shafferman *et al*, 1996).

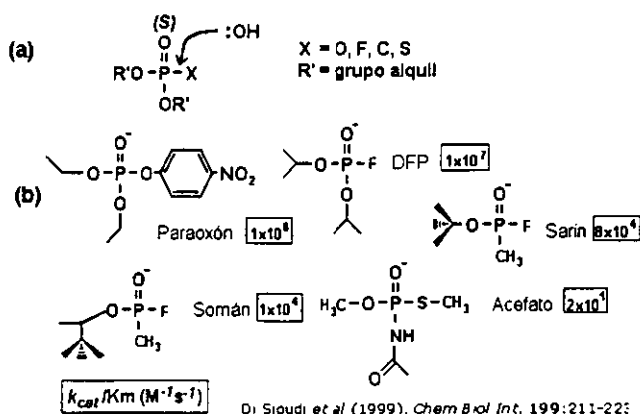


Figura 5. (a) Esquema general de la hidrólisis de un compuesto organofosforado y (b) eficiencia catalítica de algunos sustratos de la PTE(Zn^{2+}).

Las eficiencias catalíticas (k_{cat}/K_m) de la PTE nativa para esta familia de compuestos varían en ocho órdenes de magnitud (figura 5b), siendo los extremos el fosforotriéster paraoxón (diethyl *p*-nitrofenil fosfato; $k_{cat}/K_m = 5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$) y el fosfonotiolato acetato ($k_{cat}/K_m = 2 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$). Esta promiscuidad catalítica hace de la PTE un candidato prometedor para el tratamiento a exposición con compuestos organofosforados.

En presencia de la PTE la hidrólisis de paraoxón se acelera en un factor de 10^{12} (k_{cat}/k_{uncat}). Los valores de la k_{cat} y la k_{cat}/K_m para esta reacción son 10^4 s^{-1} y $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivamente (Dumas *et al*, 1989; Omburo *et al*, 1992). La elevada eficiencia catalítica para la hidrólisis de paraoxón catalizada por la fosfotriesterasa se encuentra cerca de la constante de reconocimiento bimolecular controlada por difusión ($10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Fersht, 1985a). Más aun, la correlación de Brønsted y experimentos que muestran la dependencia de la reacción con la viscosidad del solvente refuerzan la idea que el proceso de difusión, más que el proceso químico de la hidrólisis del enlace, es el factor limitante en la hidrólisis de paraoxón por la fosfotriesterasa (Caldwell *et al*, 1991).

Fersht (1985b) sugirió que, tanto una k_{cat}/K_m elevada como una K_m mayor que la concentración fisiológica del sustrato, pueden ser empleados como criterios para juzgar si una enzima ha evolucionado su tasa máxima de catálisis. Tomando estos parámetros, Fersht concluye que tanto la trifosfato isomerasa (TIM) como la anhidrasa carbónica han alcanzado dicho máximo, lo cual se logró - y se ha mantenido - a través de millones de años de mutación y selección.

La síntesis del paraoxón y otros fosfotriésteres empleados como insecticidas fue reportada por primera vez en 1950 (Schrader, 1950) y el gen *opd* fue identificado en 1988 (McDaniel *et al*, 1988; Mulbry y Karns, 1989), lo que limita 40 años - tal vez menos, Munnecke, *et al* 1974 - al tiempo requerido para la evolución del reconocimiento del paraoxón y un mecanismo para su hidrólisis. Muy probablemente, la enzima que dio origen a la PTE era una hidrolasa en la bacteria cuya promiscuidad catalítica permitió la selección de la hidrólisis de paraoxón, sustrato por el cual tenía cierta afinidad (Scanlan y Reid, 1995; O'Brien y Herschlag, 1999).

La fosfotriesterasa de *Pseudomonas diminuta* y *Flavobacterium sp*, ambas bacterias de vida libre de suelo (Spiers *et al*, 2000; Jooste y Hugo, 1999) podría replantear cuáles son los tiempos requeridos para la evolución

molecular de conocerse la estructura y función de la enzima que le dio origen.

Mecanismo catalítico y sitio de unión al sustrato en la PTE

Actualmente, las estructuras cristalográficas obtenidas de la fosfotriesterasa son la apoenzima (1PTA²; Benning *et al*, 1994), la PTE-Cd²⁺/Cd²⁺³ con el sitio activo ocupado por un análogo del paraoxón, el dietil 4-metilbenzilfosfonato (EBP) (1PSC; Benning *et al*, 1995), la PTE-Zn²⁺/Zn²⁺ también en presencia de EBP (1DPM; Vanhooke *et al*, 1996), la PTE-Zn²⁺+II en complejo con el inhibidor diisopropil-metil-fosfonato, análogo de gas nervioso sarin, (1EZ2) y con el inhibidor trietil-fosfato (1EYW; Benning *et al*, 2000).

Las estructuras tridimensionales han mostrado que, aun cuando existen algunas diferencias entre la geometría del centro de metales de la PTE-Zn²⁺/Zn²⁺ y la PTE-Cd²⁺/Cd²⁺, el metal más enterrado en la estructura se encuentra ligado a los residuos H55, H57 y D301, mientras que el metal más expuesto se encuentra coordinado a la H201, la H230 y a dos moléculas de agua. Dos ligandos unen ambos iones entre sí, el carbamato formado por la carboxilación del grupo amino ε de la K169 y una molécula de oxígeno en la forma de un ion hidrógeno (recuadro de la figura 6; Benning *et al*, 1995; Zhan *et al*, 1999).

Debido a la ausencia de interacciones electrostáticas directas entre el inhibidor y la proteína en el sitio activo, así como su orientación con respecto al ion más expuesto – a 3.5 Å de distancia – y experimentos con compuestos organofosforados con centros quirales (Lewis *et al*, 1988), se ha propuesto que el mecanismo catalítico es un proceso tipo S_N2 donde una molécula de agua, activada por centro bimetálico, ataca el centro fosforil del

² Código del archivo en el *Protein Data Bank*, (Berman, 2000).

³ Holoenzima con dos átomos Cd²⁺ en centro bimetálico.

sustrato. Como resultado de esto hay un desplazamiento con una inversión en la configuración estereoquímica del grupo saliente (figura 6).

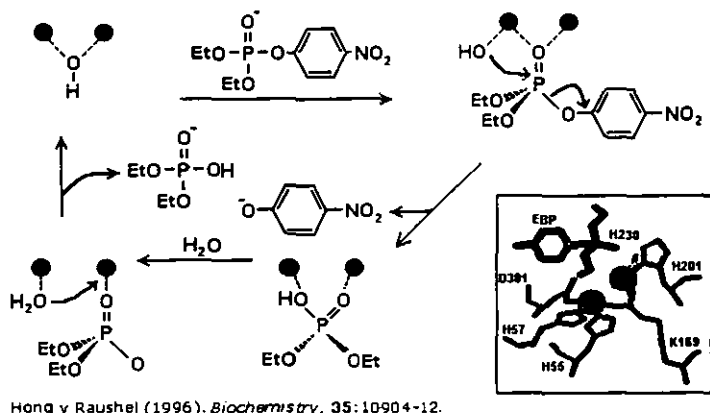


Figura 6. Mecanismo catalítico propuesto para el hidrólisis de paraoxón. En el recuadro se muestra la estructura cristalográfica del centro bimetálico de la PTE (Vanhook et al, 1996).

A partir de la estructura tridimensional de $\text{al PTE-Zn}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ se propuso que la orientación de los sustratos en el sitio de unión – netamente hidrofóbico – se debe a tres subcavidades diferentes (figura 7). El subsitio del brazo *pro-R* es predominantemente determinado por los residuos G60, I106, L303 y S308. El subsitio del brazo *pro-S*, se forma por las cadenas laterales de H254, H257, L271 y M317, mientras que los residuos localizados alrededor de la subcavidad del grupo *metilbenzil* son W131, F132, F306 y Y309.

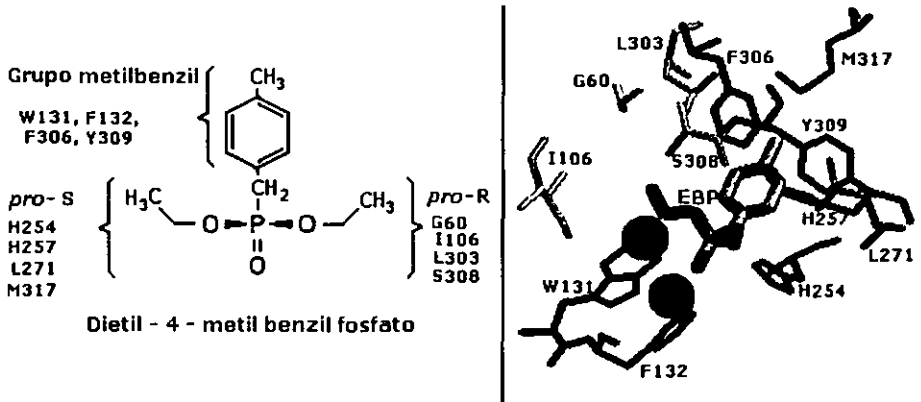


Figura 7. Regiones del sitio de unión al sustrato de la PTE.

Proteínas homólogas a la PTE

Actualmente se conocen proteínas homólogas a la fosfotriesterasa en *Rattus norvegicus* (Davies *et al*, 1997), *Mus musculus* (Hou *et al*, 1996), *Mycoplasma pneumoniae* (Himmelreich *et al*, 1996; Dandekar *et al*, 2000), *Deinococcus radiodurans* (White *et al*, 1999), *Escherichia coli* (Scanlan y Reid, 1995; Buchbinder, 1998), *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al*, 1998; Philipp *et al*, 1996); *Homo sapiens* (Alimova-Kost *et al*, 1998) y *Nocardiodes simplex* (Mulbry, 2000). En general, la fosfotriesterasa bacteriana comparte entre el 27-30% de identidad en la secuencia primaria con sus proteínas homólogas.

En el caso de la proteína homóloga a la PTE de *Escherichia coli* (ePHP) ésta comparte 28% de identidad y 66% de semejanza en la estructura primaria con la fosfotriesterasa (Scanlan y Reid, 1995). A diferencia del gen *opd* que se encontró en dos plásmidos diferentes, la localización del gen que codifica para la ePHP (*ephp*) se encontró en el cromosoma de *Escherichia coli*. La ePHP (fig. 4) ha sido sometida a ensayos de actividad de esterasa, aminopeptidasa, sulfatasa, fosfatasa, anhidrasa carbónica, fosfodiesterasa y fosfotriesterasa (con *p*-nitrofenil acetato, L-alanina nitroanilida, *p*-nitrofenil

sulfato, bis(*p*-nitrofenil) fosfato, paraoxón y *p*-nitrofenil fosfato) y en ningún caso presentó actividad (Buchbinder, 1998).

Empleando cDNA del gen de la proteína homóloga a la fosfotriesterasa de rata (*rpr-1*) como sonda de hibridación *in situ* (Davis *et al*, 1997), se aisló un gen (Alimova-Kost *et al*, 1998) cuyo producto polipeptídico poseía 27% de identidad con la PTE y 31% con la ePHP. A esta proteína se le llamo proteína relacionada a la fosfotriesterasa de humano o hPTEr, de la cual no se posee información cristalográfica.

PTE vs. ePHP

Una de las características distintivas de la familia de la fosfotriesterasa – que incluye la PTE y la ePHP – es la distorsión elíptica que presenta el barril α/β y la hélice α_9 que cubre la región N' del barril. De hecho existe una congruencia estructural entre ambas proteínas, la cual queda al descubierto al empalmar sus estructuras terciarias.

Dejando fuera las regiones de las asas $\beta_1 \alpha_1$ (residuos 17 – 32 en la ePHP), $\beta_5 \alpha_5$ (160-164), $\beta_7 \alpha_7$ (213-217), $\beta_8 \alpha_8$ (242-256) la raíz de la desviación cuadrática media (rms) entre los átomos de la cadena principal de PTE y ePHP es de 1.7 Å. Más aún, dentro de las regiones consideradas dentro del empalme, las estructuras con mayor desviación son el asa $\beta_4 \alpha_4$ con una desviación rms de 2.4 Å, el asa $\beta_6 \alpha_6$ (185-193) con una desviación rms de 3.5 Å, la hélice α_8 con una desviación de 2.1 Å y el asa que une las hélices α_8 con la α_9 (Buchbinder *et al*, 1998). Como se observa en este análisis cuantitativo, la mayor diferencia entre las estructuras de la PTE y la ePHP está precisamente en las asas de la región C' terminal del barril.

Al comparar cualitativamente las α -hélices que forman el barril y los centros de metales de la PTE y la ePHP empleando el programa en línea ProModII (Peitsch 1995; Peitsch 1996, Peitsch y Guex, 1997a, Peitsch y Guex 1997b), se puede apreciar hasta que punto son semejantes estas regiones

en ambas proteínas (figura 12 a y b). La única diferencia conspicua se presenta entre el empleo de la lisina carbamilada (K169) para unir el par metálico en PTE a diferencia del glutámico (E125) que cumple la misma función en la ePHP. A pesar de esta diferencia, la estructura de la cadena principal justifica la longitud de la cadena lateral de la lisina o del glutámico permitiendo así que el par de metales se encuentren en la misma posición.

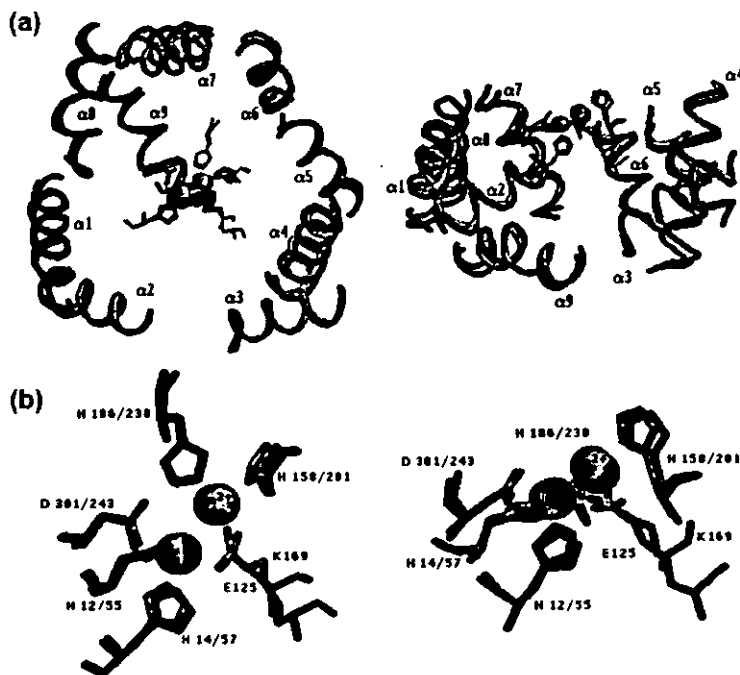


Figura 12. Empalmes de las estructuras terciarias de la PTE y ePHP. **(a)** Se muestran cuán semejante resultan el armazón de las hélices a que rodean al barril. **(b)** Más importante aún es el sobrelape casi perfecto de los centros metálicos de ambas proteínas.

Capítulo II: Antecedentes

Evolución dirigida en barriles α/β

El arquetipo que los barriles α/β consiste al menos de 200 residuos formando ocho β -plegadas rodeadas y conectadas entre sí y por α -hélices. El plegamiento en forma de barril α/β es el segundo patrón estructural con mayor abundancia presente en los organismos celulares (Wolf *et al*, 1999) y se encuentra en 46 diferentes funciones enzimáticas, abarcando cinco de las seis clases de enzimas, incluso es empleado en funciones no enzimáticas (Todd *et al*, 1999). La versatilidad de plegamiento de barril α/β radica en la relativa polarización entre el sitio de unión al sustrato y el andamiaje catalítico (Bränden, 1991; Bränden y Tooze, 1999).

Altamirano y colaboradores (2000a) propusieron una estrategia general que combina el diseño racional y la evolución dirigida para diseñar nuevas actividades catalíticas en el andamio de los barriles α/β : la combinación entre las asas de unión específica a sustrato y el barril que incluye el mecanismo catalítico (diseño racional), posteriormente acoplado a recombinación y selección. Siguiendo esta estrategia fue posible conferir la actividad de la fosforibosil antranilato isomerasa (PRAI) a la estructura de la indol-2-glicerol-fosfato sintasa (IGPS). Esto se logró combinando el sitio de unión al sustrato de la PRAI con el andamio catalítico de la IGPS. Esta nueva enzima (*iv*PRAI) tiene propiedades catalíticas similares a la PRAI natural pero una mayor constatación de especificidad.

En *Escherichia coli*, la PRAI y la IGPS forman un complejo covalente que cataliza dos pasos consecutivos en la ruta metabólica de biosíntesis del triptófano (Kirschner *et al*, 1987). Estas enzimas, con una identidad en la estructura primaria del 22%, comparten un ligando común: el producto de la PRAI y sustrato de la IGPS (carboxifinilamino-1'-deoxirribulosa-5'-fosfato o CdRP). A pesar de tener sustrato en común la IGPS no isomeriza el

fosforibosil-antranilato y la PRAI no cataliza la formación del anillo indol en el CdRP. Este modelo de sustrato común pero diferente actividad enzimática representa una excelente prueba para la hipótesis de conservación del andamio en la evolución divergente de barriles α/β .

Clasificación general de los barriles α/β

La actividad catalítica y la especificidad de sustrato son características funcionales de las enzimas. Sus determinantes estructurales pueden ser independientes, lo que confiere una ventaja evolutiva a la enzima, ya que la activación puede ser modificada sin comprometer la especificidad de sustrato y viceversa (Todd *et al*, 1999). La especificidad hacia un sustrato es directamente determinante de la naturaleza de los residuos de unión a este, por lo que la evolución del reconocimiento de sustratos ha modificado los sitios de unión. Un caso clásico de esta especialización estructural puede verse en las enzimas con plegamiento de barril α/β .

Altamirano y Fersht (2000b) notaron que el dominio de los barriles α/β puede ser clasificado dentro de dos grandes grupos de acuerdo a la arquitectura de las asas del extremo carboxilo. Las asas de la región C' terminal, según los autores, pueden clasificarse en tres grupos: asas tipo *tapa* ($\beta 1\alpha 1$, $\beta 6\alpha 6$), *cuerpo* ($\beta 2\alpha 2$, $\beta 4\alpha 4$, $\beta 7\alpha 7$, $\beta 8\alpha 8$) y *comodín* ($\beta 3\alpha 3$, $\beta 5\alpha 5$). La diferencia principal entre la IGPS y la PRAI reside en tres elementos estructurales: las asas $\beta 1\alpha 1$ y $\beta 6\alpha 6$ y la extensión que precede a la primer hebra beta del barril. Precisamente estas tres estructuras forman una "tapa" – por eso el nombre de dichas asas – sobre el sitio catalítico, cubriéndolo total o parcialmente del solvente. La Clase I, representada por la PRAI, (1) carece de una extensión en el extremo N' terminal o tiene un segmento muy corto (de 4 o 5 residuos) generalmente acompañado de una asa $\beta 1\alpha 1$ corta; (2) el asa $\beta 6\alpha 6$ es rica en glicinas con los arreglos GXXGXG, GX, DGXX(G/T/S)G o GXXG. La Clase II (IGPS) en cambio posee (1) una

extensión en la región N' terminal entre 20-70 residuos; (2) una asa $\beta 1\alpha 1$ de 15-20 residuos; (3) y ausencia de glicinas en el asa $\beta 6\alpha 6$. A diferencia de las asas "tapa" quienes principalmente determinan el mecanismo catalítico, las asas tipo *cuerpo* – llamadas así porque se encuentran cerca del cuerpo del barril – son el componente principal de unión al sustrato. Las asas "comodín" pueden estar involucradas tanto en la unión de sustratos o en el mecanismo catalítico. Esta clasificación de las proteínas con estructura de barriles α/β muestra hasta qué grado puede ser llevada por la evolución natural la especialización intraenzimática. Especialización estructural que puede ser aprovechada en el diseño y rediseño de nuevas actividades catalíticas *in vitro*.

Hipótesis

Dada (1) la relativa independencia estructural y funcional de las asas del extremo carboxilo en las estructuras de barril α/β ; (2) la gran congruencia estructural entre los barriles de la PTE y de las PHP⁴; así como (3) la presencia de un sitio activo casi idéntico en estas proteínas, pero (4) con un sitio de unión al sustrato diferente (responsable de la carencia de actividad de fosfotriesterasa en las PHP); entonces será posible conferir dicha actividad a las PHP cambiando las asas responsables de la unión al sustrato en la PTE por sus homólogas en las PHP.

Si el recambio de dichas asas no es suficiente para la aparición de actividad en las PHP, entonces se generarán bibliotecas mediante variación dirigida, cuyas clonas positivas serán seleccionadas para su posterior recombinación *in vitro*.

⁴ Proteínas homólogas a la fosfotriesterasa: ePHP o hPTER.

Objetivo general

El presente trabajo pretende extender a la superfamilia de las hidrolasas dependientes de metal, la estrategia de diseño racional/evolución dirigida (figura 8), propuesta por Altamirano y colaboradores (2000a) para la transferencia de actividades enzimáticas. Con ello se pretende probar que es posible conferir actividad de fosfotriesterasa a las PHP, proteínas que no unen ni al sustrato (paraoxón) ni a los productos (*p*-nitrofenol y dietilfosfato) de la reacción de hidrólisis catalizada por la PTE, mediante dicha estrategia. Con ello probar que dicha estrategia también puede ser empleada en proteínas que no compartan ligando alguno.

Objetivos particulares

Conforme al esquema general propuesto para el presente trabajo (figura 8), los objetivos particulares serán (1) la creación de los híbridos PHP(PTE) con el cambio de las asas responsables de la unión al sustrato en la PTE por sus homólogas en las PHP; (2) montar un sistema de selección y tamizado que permita seleccionar o detectar actividad de fosfotriesterasa; (3) generar bibliotecas inteligentes, cuya diversidad se encuentre restringida al sitio de unión al sustrato.

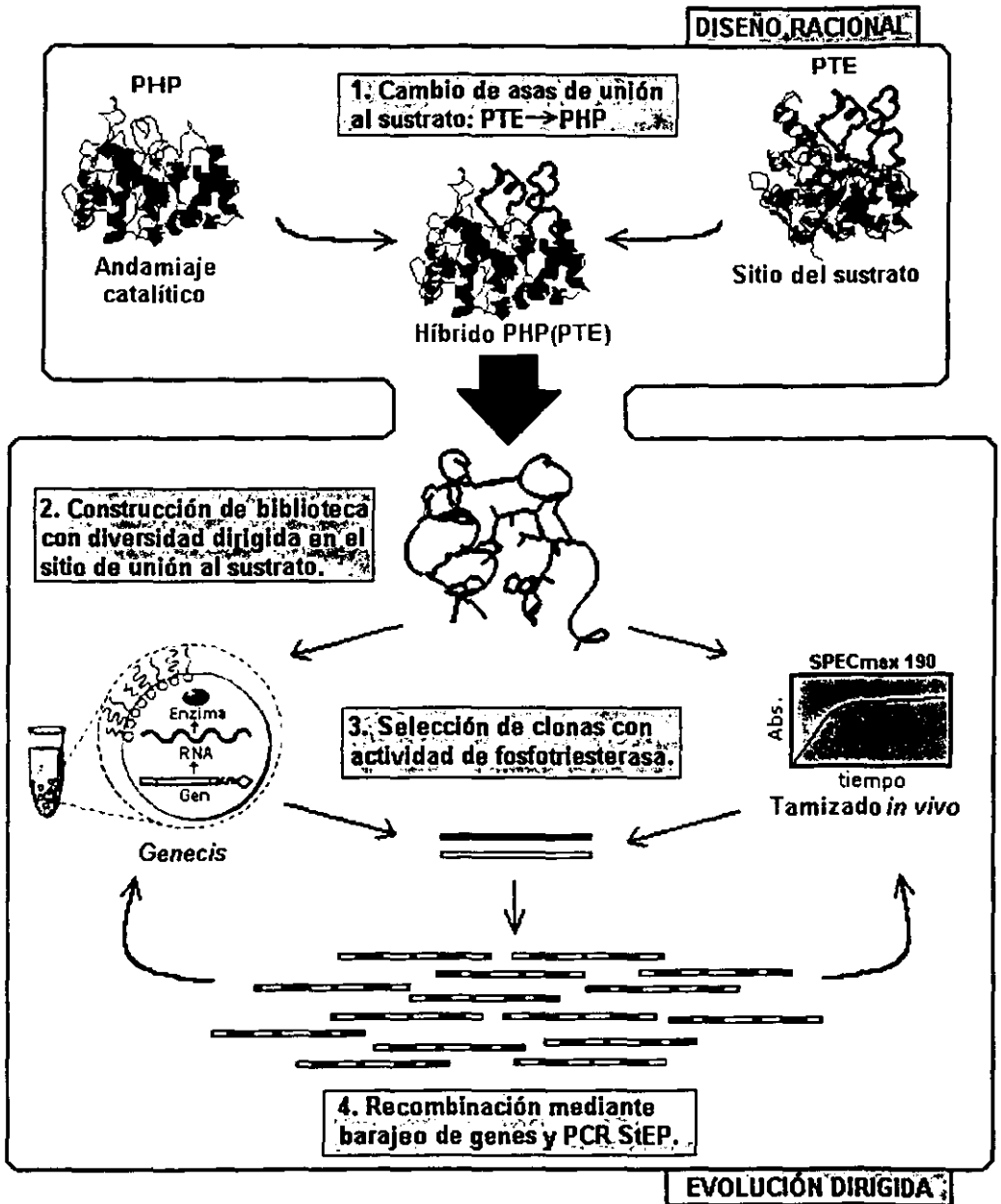


Figura 8. Esquema general del trabajo.

Capítulo III: Resultados

Determinación del tipo de asas

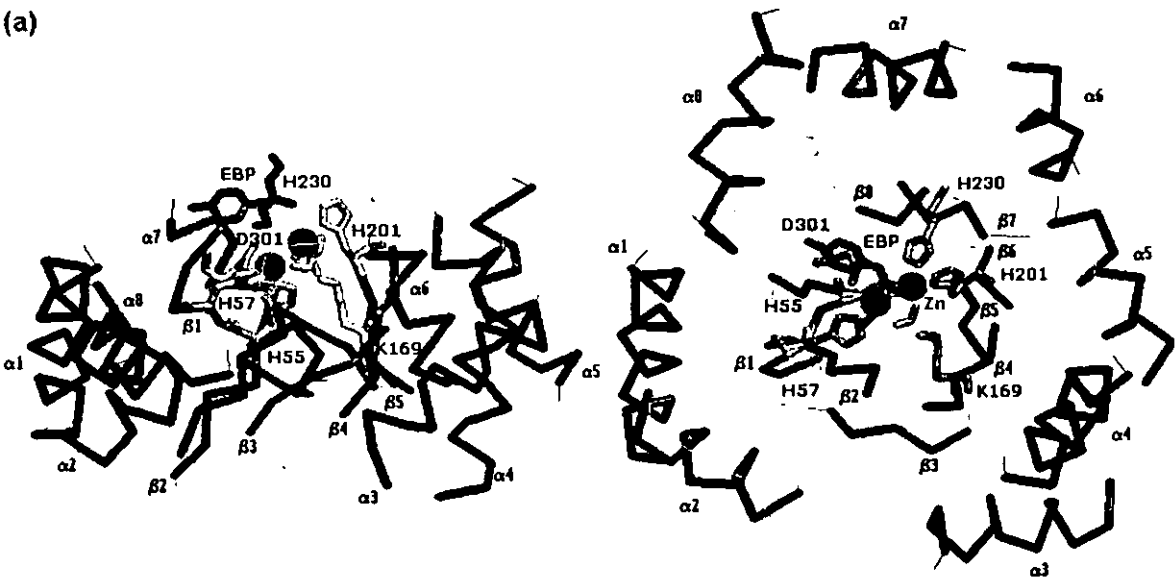
Fosfotriesterasa

De acuerdo con lo propuesto por Altamirano y Fersht (2000b), se observa que los residuos involucrados en el mecanismo catalítico – aquellos que unen a los iones metálicos a la estructura – se encuentran en asas tipo *tapa* ($\beta 1\alpha 1$ y $\beta 6\alpha 6$) y *comodín* ($\beta 5\alpha 5$), con la salvedad que dos se encuentran en asas tipo *cuerpo* ($\beta 4\alpha 4$, $\beta 8\alpha 8$) (Tabla I). Ya que estos residuos están localizados en los extremos N' de sus respectivas asas puede interpretarse como si éstos se encontraran embebidos en la estructura del barril (figura 9a).

Por otro lado, los residuos involucrados directamente con la unión al sustrato se localizan en las asas tipo *cuerpo* ($\beta 2\alpha 2$, $\beta 7\alpha 7$, $\beta 8\alpha 8$) y *comodín* ($\beta 3\alpha 3$) (figura 9b y Tabla I). En la figura 10 se muestra en detalle una imagen estereográfica de las asas P1 y p2 y el sitio activo (a) y su localización en la secuencia primaria de la proteína (b).

En la figura 10b también se muestran las tres características que hacen pertenecer a la fosfotriesterasa a la Clase II – al igual que la ePHP y la hPTER como se verá más adelante – de la clasificación propuesta por Altamirano y Fersht: (1) la extensión en la región N', (2) asa prominente $\beta 1\alpha 1$ y (3) ausencia del patrón de glicinas en el asa $\beta 6\alpha 6$.

(a)



(b)

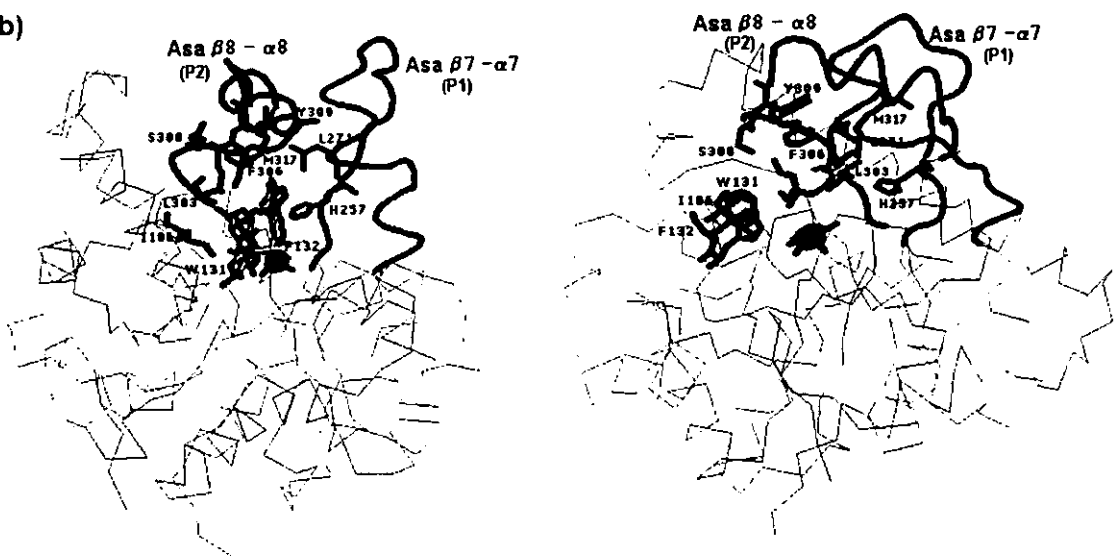


Figura 9. (a) Residuos involucrados en la unión de los iones metálicos que actúan como ácidos de Lewis en el mecanismo catalítico de la fosfotriesterasa. (b) Dos vistas laterales de la fosfotriesterasa con detalle en el sitio activo y su distribución en las asas que unen el $\beta 7$ con el $\alpha 7$ (asa P1) y el $\beta 8$ con el $\alpha 8$ (asa P2).

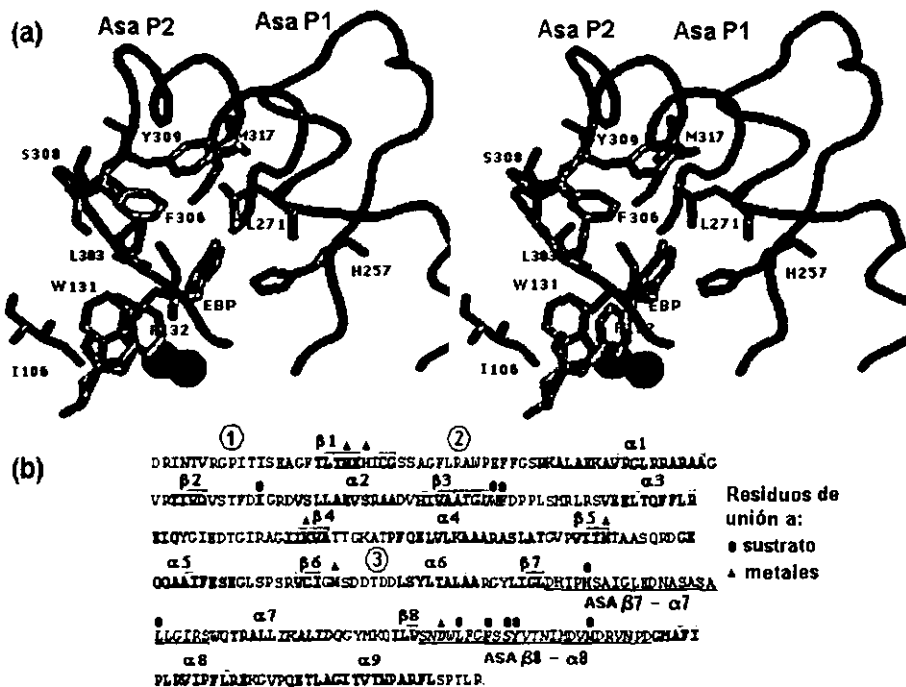


Figura 10. (a) Detalle de del sitio de unión al sustrato de la PTE. No se muestran las estructuras completas de las asas $\beta 2$ $\alpha 2$ y $\beta 3$ $\alpha 3$, ni el centro bimolecular. (b) Secuencia de la PTE, donde se observan las posiciones de las α -hélices y estructuras β que forman el barril y la localización de los residuos que unen a los iones metálicos y al sustrato. Se muestran también, las tres características de la Clase II de los barriles α/β : (1) extremo N' terminal de 17 residuos, (2) prominente asa $\beta 1$ $\alpha 1$ y (3) ausencia de los patrones de Gly en el asa $\beta 6$ $\alpha 6$.

Tabla I. Distribución de residuos del centro bimolecular y de reconocimiento del sustrato.

ASAS	Clasificación	Unión metales (PTE/ePHP/hPTER)	Unión sustrato en la PTE	Unión sustrato en la ePHP ¹
$\beta 1$ $\alpha 1$	Tapa	H55/12/26 H57/14/28		L19, I17
$\beta 2$ $\alpha 2$	Cuerpo		I106	
$\beta 3$ $\alpha 3$	Comodín		W131, F132	Y84, D86
$\beta 4$ $\alpha 4$	Cuerpo	K169/E125/E169		
$\beta 5$ $\alpha 5$	Comodín	H201//158/201		F161
$\beta 6$ $\alpha 6$	Tapa	H230/186/230		L189
$\beta 7$ $\alpha 7$	Cuerpo		H257, L271	K213, Y216
$\beta 8$ $\alpha 8$	Cuerpo	D301/243/298	L303, F306, S308, Y309, M317	H245, R246, T245

1.- No se conoce sustrato alguno para la ePHP, pero se han propuesto que estos residuos están involucrados en la unión de sustrato por su posición cerca del sitio activo.

Proteína homóloga a fosfotriesterasa en *Escherichia coli* (ePHP)

Al analizar la única estructura cristalográfica disponible de la ePHP (1BF6; Buchbinder *et al*, 1998) puede observarse la especialización estructural característica de los barriles α/β . Al igual que la PTE, la ePHP posee un centro bimetálico que une dos iones por monómero (figura 11), aunque a diferencia de la primera, que puede admitir Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} o Mg^{2+} sin pérdida de actividad (Hong y Raushel, 1996), la ePHP une en su estructura con mayor afinidad iones Zn^{2+} . Los residuos involucrados en la unión del ion más embebido en la estructura son H12, H14 y D243, mientras que el ion más expuesto se coordina con los residuos H158 y H186. Ambos iones se unen entre sí por medio de una molécula de agua y el residuo E125.

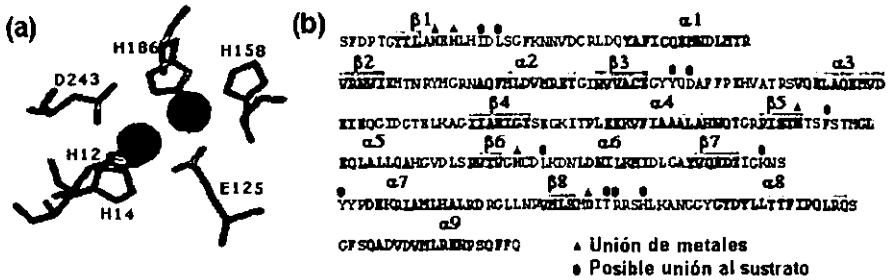


Figura 11. (a) Detalle del centro bimetálico de la ePHP y (b) localización en la primaria de la ePHP, donde se observa las posiciones de las α -hélices y estructuras β que forman el barril y la localización de los residuos que unen a los iones metálicos y aquellos posiblemente relacionados con la unión al sustrato. Se muestran también dos de las tres características de la Clase II de los barriles α/β : (1) una prominente asa $\beta 1 \alpha 1$ y (2) ausencia de los patrones de glicinas en el asa $\beta 6 \alpha 6$.

Como se mencionó anteriormente no se conoce sustrato para la ePHP, por lo que los residuos involucrados en el sitio activo sólo pueden inferirse por su cercanía al sitio activo. Algunos de estos posibles residuos son L18, I17, Y84, D86, F161, L189, Y216, K213, T245, H249, y R246 (figura 11b), los cuales se encuentran localizados en las asas *cuerpo* ($\beta 2 \alpha 2$, $\beta 7 \alpha 7$, $\beta 8 \alpha 8$) y en una asa *comodín* ($\beta 3 \alpha 3$) (Tabla I). La ePHP presenta la asa $\beta 1 \alpha 1$ y la

ausencia de los patrones de glicinas en el asa $\beta_6 \alpha_6$ características de la clase II de barriles α/β , aun cuando no presenta extensión en el extremo amino (figura 11b).

Proteína homóloga a la fosfotriesterasa de humano (hPTER).

A la fecha, no está reportada ninguna estructura cristalográfica de la hPTER; sin embargo, es posible detectar algunas características relevantes para este trabajo empleando programas de predicción estructural. Usando como molde la ePHP, se obtuvo una estructura tridimensional aproximada de la hPTER (figura 13a) usando el programa en línea ProModII. También se realizaron alineamientos estructurales de la hPTER, ePHP y PTE (figura 13b), empleando el mismo programa, donde destaca la conservación de los residuos del centro metálico.

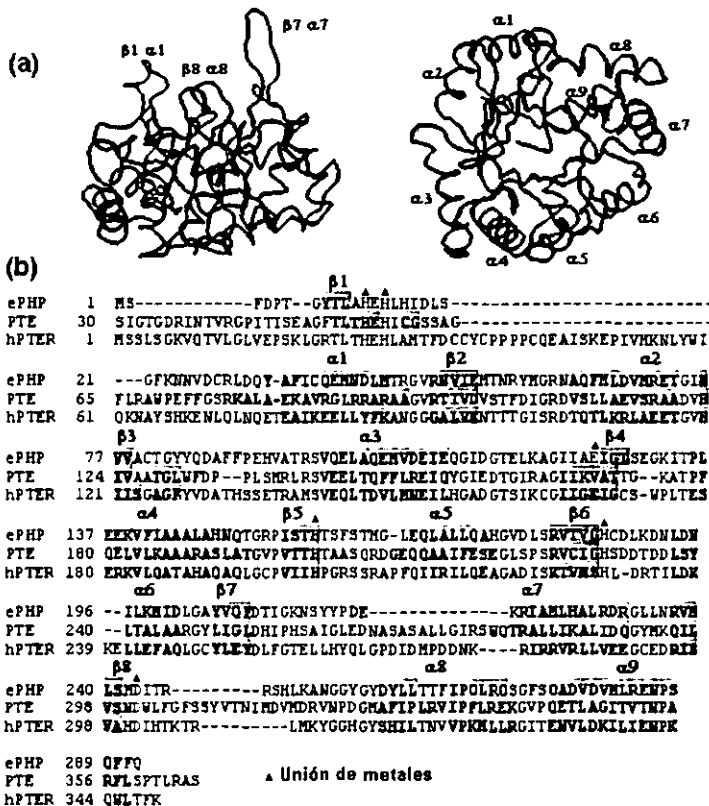


Figura 13. (a) Predicción de la estructura terciaria de la hPTE empleando como molde la ePHP. Las regiones donde no hay congruencia estructural son las asas $\beta 1 \alpha 1$ (no incluida en el modelo), $\beta 7 \alpha 7$ y $\beta 8 \alpha 8$. **(b)** Predicción de la estructura secundaria de la hPTE y alineamiento estructural de la PTE, ePHP y hPTE. Tanto la generación de la estructura terciaria como la predicción de la estructura secundaria empleada en el alineamiento múltiple, se omitió el inicio de la hPTE debido a la extensa asa $\beta 1 \alpha 1$ que posee (45 residuos).

Construcción de híbridos

Para la sustitución de las asas $\beta 7 \alpha 7$ (P1) y $\beta 8 \alpha 8$ (P2) de la PTE por sus contrapartes en la PHP, se empleó el método de la PCR de traslape (Clackson, 1991). Este consiste en crear mediante una reacción de PCR estándar, dos fragmentos en sentidos opuestos a oligonucleótidos con al menos una región complementaria y que contienen la región a insertar. Los

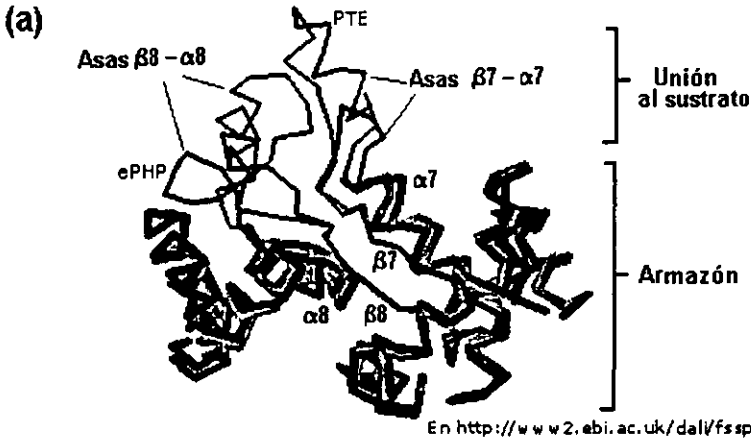
fragmentos son purificados por gel para eliminar el gen original, y en una segunda reacción de PCR estos fragmentos sirven como moldes uno del otro para ensamblar el gen ya con la región introducida (figura 15). El diseño de los oligonucleótidos determina la región que se introduce y/o elimina de la secuencia.

Dado que en el gen *pte* (llamado también *opd*) el correspondiente a las asas P1 y P2 de la PTE son regiones demasiado grandes – 78 bases de *p1* y 66 de *p2* – para ser insertadas en un sólo oligonucleótido (figura 14a y b), el recambio de cada asa se realizó en dos reacciones consecutivas de PCR de traslape. Para el diseño de los oligos necesarios para dicha técnica, las regiones *p1* y *p2* fueron divididas en dos partes: *p1a* y *p1b* para el asa $\beta 7 \alpha 7$ (P1) y *p2a* y *p2b* para el asa $\beta 8 \alpha 8$ (P2). Como se observa en la figura 14(b), estas regiones comparten 25 bases (5 residuos).

La construcción de los oligos se hizo de la siguiente forma: tanto *p1a* como *p2a* se flanquearon (por separado) en el extremo 5' con una secuencia de 25 bases correspondientes al extremo carboxilo de la β -plegada que precede al asa ($\beta 7$ para P1 y $\beta 8$ para P2); y por el extremo 3' con una secuencia de 25 bases del asa correspondiente en la estructura del asa en la PHP. Las otras regiones, *p1b* y *p2b*, se flanquearon en el extremo 5' por la secuencia que comparten con *p1a* y *p2a* respectivamente, mientras que en el extremo 3' por 25 bases correspondientes al extremo amino de la α -hélice que las precede (figura 14b).

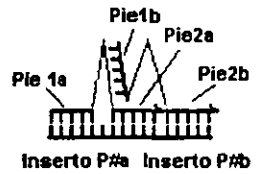
Este arreglo de *doble inserción* permite, a la vez que se insertan las regiones *p1* y *p2* de en *php*⁵, eliminar las regiones correspondientes de las asas $\beta 7 \alpha 7$ y $\beta 8 \alpha 8$.

⁵ *php* o *hpter*.



(b) Asa $\beta7\alpha7 = P1$

	Pie 1a	Pie2a	Pie1b	Pie2b
ePHP	202	LGASVIGDTIGKMSYYPDE	-----	KRTADKHALRDR
PTE	246	RCVLIIGLDRIHPSAIGLEDHNASALLGIRSWQTRALLIKALIDQ		
NPTER	247	LGCCVYVRLIGTELLHVQLGPDIDMPDDNK	----	PLRQVRLLVEE



ejemplos

P1aFOR ePHP(PTE)
LVVYVRLIGTELLHVQLGPDIDMPDDNK
YVQFDHIHPSAIGLEDNATIGKN
P1bFOR ePHP(PTE)
AGTGCATCAGCCCTCCTCGCCAICCGTTCGTGCCAAACACPTVGGTGMVGGG
LEDNASSASALLGIRSWQTRIAHL

Asa $\beta8\alpha8 = P2$

	Pie 1a	Pie2a	Pie1b	Pie2b
ePHP	233	GLLRVRLSNDITR	-----	RSHLKANGCYVYGLTTF
PTE	282	GVMKQILVSDWELFGISSVYHIMDVHDRVDPDGHATIPLRV		
NPTER	288	GCEDRILVARDINTKTR	-----	LHKYGGHCVENILTVV

Inserto P2a Inserto P2b

Figura 14. (a) Alineamiento estructural de las hélices que conforman el barril y las asas $\beta7\alpha7$ y $\beta8\alpha8$ de la ePHP y la PTE; (b) análisis del alineamiento en las regiones de P1 y P2 y la estrategia de construcción de oligos para la PCR de traslape.

ePHP + PTE = ePHP(PTE)

Las cuatro modificaciones necesarias para crear el híbrido *ephp(pte)* pueden hacerse en un orden indistinto. En la figura 15 se muestra el esquema general de una PCR de trasiape ejemplificando con la introducción de la región *p2a* en el gen *ephp*.

En el alineamiento estructural entre PTE y ePHP cercano a la zona de P2, se muestran las regiones necesarias que debe contener el oligo para insertar dicha región de P2a

		P2a	
PTE 292	YMKQILVSN	DWLF	GFSSYVTNIMDVM..DRVNP
ePHP 234	LLNR	DITR.....	NGGY..GYDYLLTTFI
	Pie 1		Pie 2

entonces, el oligonucleótido necesario para su inserción, P2afor ePHP(PTE), queda de la siguiente forma

Pie1	P2a	Pie2
<u>GTCATGCTGTCGATGGACTGGCTGTTCGGGTTTTTCGAGCTATGCACCAACATCATGCGCTCCCATTAAAAGCC</u>		
V M L S M D W L F G F S S Y V T N I M R S H L K A		

Este oligo es el equivalente al oligo C de la figura 15 – el oligo B sería el reverso y complementario de éste (no se muestra). Como correspondiente al oligo A se diseñó el oligo N-flag ePHPFor

NcoI	Extremo N' de ephp
<u>CATTGCCAAGCCATGGACTACAAAGATGACGATGATAAAATCACCAACAGCATGAGTTTGGATCCGACG</u>	
H C Q A M D Y K D D D D K I T N S M S F D P T>	

que añade en la región amino terminal de la proteína un péptido de ácidos aspárticos que servirá para la purificación de la proteína, así como el sitio de restricción *NcoI* empleado para la clonación. Por otro lado, el oligonucleótido ePHP KpnIrev equivale al oligo D

Extremo C' de ephp	KpnI
<u>AACCCTAAGCAATGGCTAACTTTCAAATAATAAGGTACCGACGTATCGA</u>	
N P K Q W L T F K * *	

que introduce el sitio de restricción *KpnI* en el extremo carboxilo de la cadena polipeptídica.

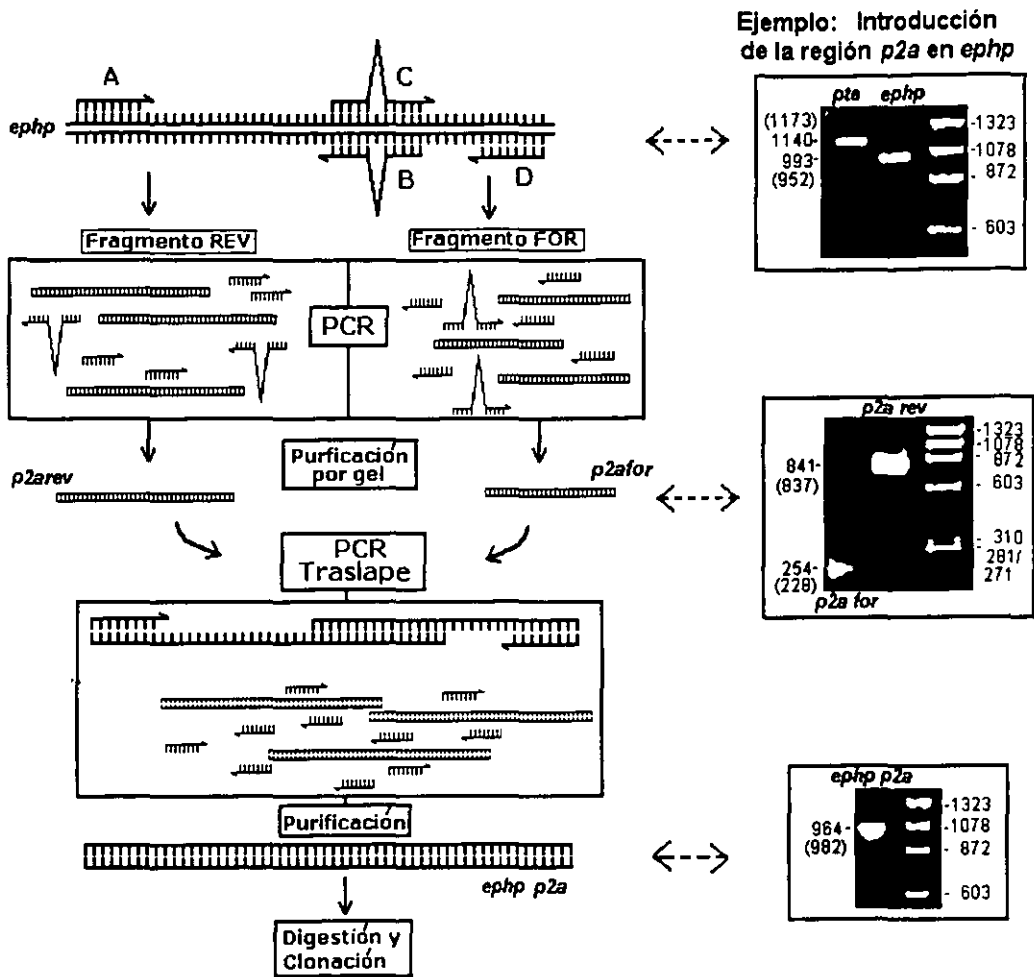


Figura 15. Diagrama general de PCR de traslape en la introducción del asa P2 en el gen ePHP. El peso obtenido - calculado con el programa GeneSnap V. 2.6 (SynGene) - se muestra a un lado del fragmento (el peso esperado calculado por secuencias en el programa MacVector™ aparece entre paréntesis). Los gels son de 1.5% de agarosa de alto punto fusión (BioGene, Kimbolton, UK) teñidos con bromuro de etidio.

Usando los oligos correspondientes (A con B y C con D) se generan dos fragmentos (REV y FOR) con direcciones contrarias con respecto a la zona de donde se hace la introducción de nuevas bases.

Posteriormente, los fragmentos se purificaron en un gel de agarosa de alto punto de fusión 1.5% para eliminar el gen original. La PCR de traslape propiamente dicha, se realizó mezclando ambos fragmentos purificados en presencia de los oligonucleótidos que flanquean al gen (A y B).

Una vez obtenido el gen *ephp p2a*, se siguieron los siguientes pasos para insertar el asa P1 (figura 16).

El oligonucleótido **P1aFOR ePHP(PTE)**

<i>ephp</i>	<i>pte</i>	<i>ephp</i>
<u>TACGTGCAGTTCGACCACNNSSSSCACAGTGC</u>	<u>GNNSSGGTCTAGAA</u>	<u>GATAATGCGACCATCGGCAAGAAC</u>
Y V Q F D H I P H S A I G L E D N A T I G K N		
Pie1	P1a	Pie2

permite insertar la primera parte del sitio P1 entre dos regiones colindantes de gen de ePHP.

		P1a
PTE	245	ARGYLIGLDHIPHSAIGLEDNASASALLGIRSWQTRALLIKALIDQG
ePHP P2a	201	DLGA [blacked out]YYPDEKRIAMLHALDRG
		Pie1 Pie2

Una vez obtenido y purificado *ephp p1a p2a*, se empleó éste como molde para insertar de la segunda parte del sitio con el oligonucleótido **P1bFOR ePHP(PTE)**

Pie3	P1b	Pie4
<u>CTAGAAGATAATGCGAGTGCATCAGCCCTCCTGGGCATCCGTT</u>	<u>TCGTGGCAAACACGTATTGCGATGCTT</u>	
L E D N A S A S A L L G I R S W Q T R I A M L		

Introducción de la región P1 usando como molde *eph p2a*

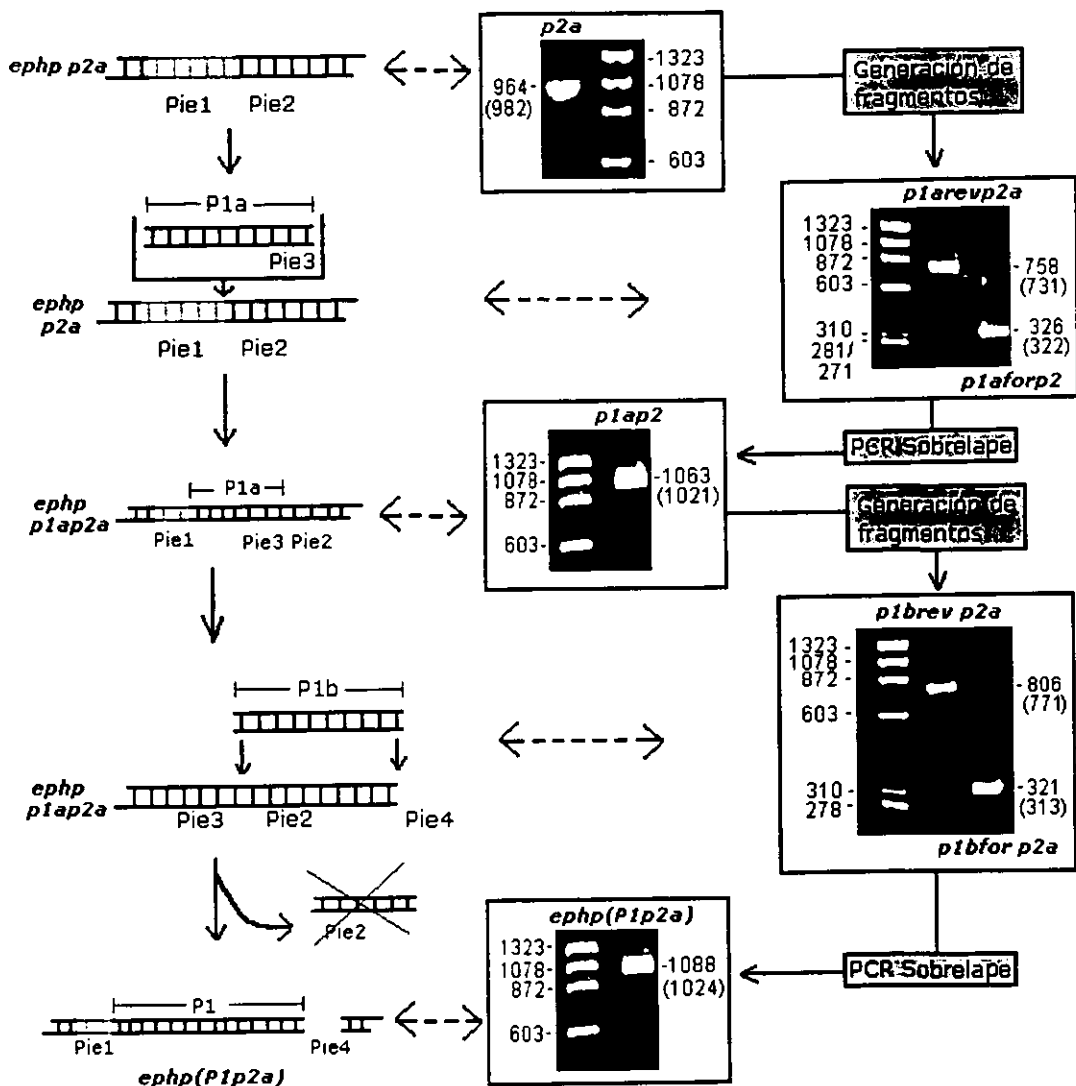


Figura 16. Introducción del asa P1 de PTE en eHP P2.

En esta segunda parte se extraen las regiones correspondientes al sitio P1 en ePHP,

		P1a		P1b	
PTE	245	ARGYLIGLDHIPHSAIGLEDNASASALLGIRSWQTRALLIKALIDQG			
ePHP P1aP2a	201	DLGAYVQFDHxxHSAxGL	■■■■■	TIGKNS.YYPDEKPTA	HALRDRG
		Pie3		Pie4	

obteniendo así, la inserción completa del sitio P1

		P1 (P1a + P1b)	
PTE	245	ARGYLIGLDHIPHSAIGLEDNASASALLGIRSWQTRALLIKALIDQG	
ePHP P1P2a	201	DLGAYVQFDHxxHSAxGLEDNASASALLGIRSWQTR	■■■■■
ePHP	201	DLGAYVQFDTIGKNS.....YYPSEKPTAL	■■■■■
		Pie1	Pie4

Con respecto de la diversidad estructural introducida en la región P1a mediante codones degenerados se hablará con detalle más adelante.

Una vez completada la inserción de P1, se terminó la construcción la región P2 empleando el gen *ephP P1b2a* como molde y empleando el oligo P2bfor ePHP(PTE)

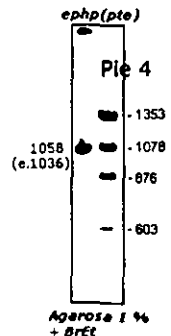
Pie3	P2b	Pie4
<u>GTCACCAACATCATGGACGTGATGGATCGCGTGAACCCCGACCGCTATGACTATTTA</u>		
V T N I M D V M D R V N P D G Y D Y L		

En esta continuación de la construcción del asa P2, se terminan de extraer las regiones correspondientes al asa $\beta 8 \alpha 8$ de ePHP,

		P2b	
PTE	292	YMKQILVSNWDLFGFSSVVTNIM.DVM..DRVNPDGMAFIPLRVI	
ePHP P1P2a	258	LLNRVMLSMDWDLFGFSSVVTNIMRSHLkaNGGY..	■■■■■
		Pie 3	Pie4

obteniendo así, la inserción completa del sitio P2 y terminando la construcción del gen híbrido *ephP(pte)*.

PTE	292	YMKQILVSNWDLFGFSSVVTNIM.DVM..DRVNPDGMAFIPLRVI	
ePHP (PTE)	258	LLNRVMLSMDWDLFGFSSVVTNIM.DVM..DRVNPD	■■■■■
ePHP	234	LLNRVMLSMDITR..... RSHLkaNGGY..	■■■■■
		Pie 1	Pie 4



En la tabla II se muestra el tamaño de las modificaciones en diversos puntos del proceso de construcción.

Una vez obtenido, el gen *ephp(pte)* se cortó con las enzimas de restricción *NcoI* y *KpnI*, al igual que el plásmido pGEM-4z modificado, donde fue clonado. El pGEM-4z es un vector que puede ser usado en una clonación estándar o en síntesis de RNA *in vitro*. Este vector contiene los promotores para las RNA polimerasas SP6 y T7 – el empleado en este caso – flanqueados por una región de clonación múltiple. La modificación extra se refiere a la introducción de una región de reconocimiento del ribosoma para permitir la traducción del gen *in vitro*.

Ambas digestiones se purificaron por gel y ligaron. Posteriormente se transformó en la cepa TG1 de *Escherichia coli* (Hellmuth *et al*, 1994) mediante electroporación. De las colonias obtenidas se realizaron PCR de tamizado con oligos del vector (externos al inserto; LMB3/LMB2), inóculos para extracción de plásmidos y ensayo de actividad.

Tabla II. Tamaño de modificaciones en residuos/bases.

	ePHP / <i>ephp</i>			hPTER / <i>hpter</i>		
	Delecciones	Inserciones	Total	Delecciones	Inserciones	Total
P1a	- - -	+13/39	+13/39	- - -	+13/39	+13/39
P1b	-7/21	+13/39	+6/18	-22/66	+13/39	-9/27
P1	-7/21	+26/78	+19/57	-22/66	+26/78	-4/12
P2a	-3/9	+13/39	+10/30	-3/9	+13/39	+10/30
P2b	-10/30	+9/27	-1/3	-10/30	+9/27	-1/3
P2	-13/39	+22/66	+9/27	-13/39	+22/66	+9/27
P1P2	-20/60	+48/144	+28/84	-35/105	+48/144	+13/39

hPTER + PTE = hPTER(PTE)

En un proceso similar al anterior, se construyó el gen híbrido *hpter(pte)*. La primer diferencia, aunque no fundamental, es la longitud del molde y de los fragmentos obtenidos (tabla III y figura 17). Los oligonucleótidos empleados se muestran el capítulo V.

Tabla III. Tamaños de los diferentes moldes y construcciones.

GENE	CDS p.b.	a.a.	MW (bp x 110) ¹
<i>pte</i>	1014	338	37.18
<i>ephp</i>	876	292	32.1
<i>ephp(pte)</i>	960	320	35.2
<i>hpter</i>	1047	349	38.4
<i>hpter(pte)</i>	1086	362	39.82
<i>igps</i>	780	260	28.6
<i>ephp(igps)</i>	894	298	32.7

1.- Peso del producto polipeptídico asociado en kDa.

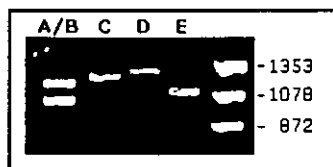


Figura 17. Construcciones. A/B *pte/ephp*; C *hpter*. (D) *hpter(pte)*; (E) *ephp(igps)*.

La segunda diferencia entre la construcción de *ephp(pte)* y *hpter(pte)* fue la aparición de una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *NcoI* – la cual se pretendía usar para la clonación. Para solucionar el problema que el gen se cortara por la mitad en la digestión para la clonación, se sintetizaron un par de oligos, los cuales, empleando una PCR de traslape, eliminaron el sitio extra de *NcoI* en el gen (figura 18).

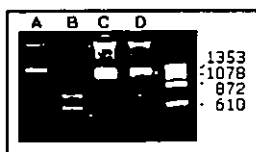


Figura 18. Quitando el sitio de restricción interno *NcoI* de *hpter(pte)*. (A) *hpter(pte)* sin enzimas de restricción; (B) *hpter(pte)* más *NcoI*; (C) *hpter(pte)* modificada sin digerir; (D) *hpter(pte)* modificada digerida con *NcoI*

Una vez modificado, el gen se digirió, ligó y clono de la misma forma que *ephp(pte)*. También se realizaron PCR de tamizado con oligos del vector (LMB3/LMB2), inóculos para extracción de plásmidos y ensayo de actividad.

ePHP + IGPS = ePHP(IGPS)

Empleando el conocimiento previo de la estructura de la IGPS (Altamirano et al, 2000a) y como parte alternativa del trabajo en la superfamilia de las hidrolasas dependientes de metal, se construyó el híbrido *ephp(igps)* (figura 17). En dicho gen, las asas $\beta 7 \alpha 7$ y $\beta 8 \alpha 8$ de la IGPS encargadas en la unión al fosfato se transfirieron a la ePHP empleando los oligos P1for ePHP(IGPS) y P2rev ePHP(IGPS) con sus oligos reverso y complementarios correspondientes.

Secuencias de los genes híbridos

Aquellas colonias que dieron positivo en la PCR de tamizado, es decir, aquellos genes que amplificados tuvieron el peso cercano al esperado, se purificaron los plásmidos y éstos se mandaron a secuenciar.

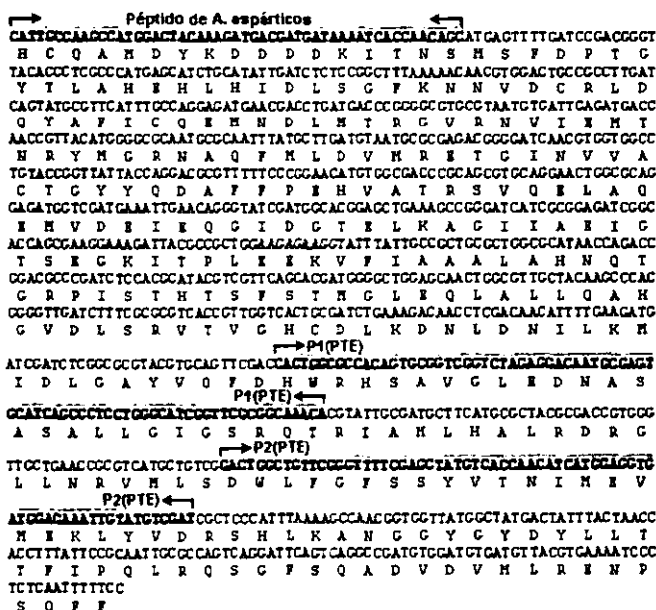


Figura 19. Secuencia del gen *ephp(pte)mut # 1* y su traducción empleando el código genético estándar (ver apéndice). Las flechas indican las regiones modificadas, correspondientes a las asas P1 y P2 de la PTE y al péptido rico en ac. aspárticos necesario para la selección *in vitro*.

En el caso de pGEM- *eph(pte)* apareció una mutación sin sentido en el residuo Q276, lo que terminaría la traducción del gen justo antes de la síntesis de la hélice $\alpha 9$. Para eliminar esta mutación, se diseñaron el par de oligos ePHPMutrev y ePHPMutfor y se empleó la construcción pGEM- *eph(pte)*#1 como molde para una PCR de traslape (no mostrado). Una vez hecho esto se reclonó el producto y se obtuvo una construcción sin dicha mutación, o pGEM - *eph(pte)mut # 1* (figura 19).

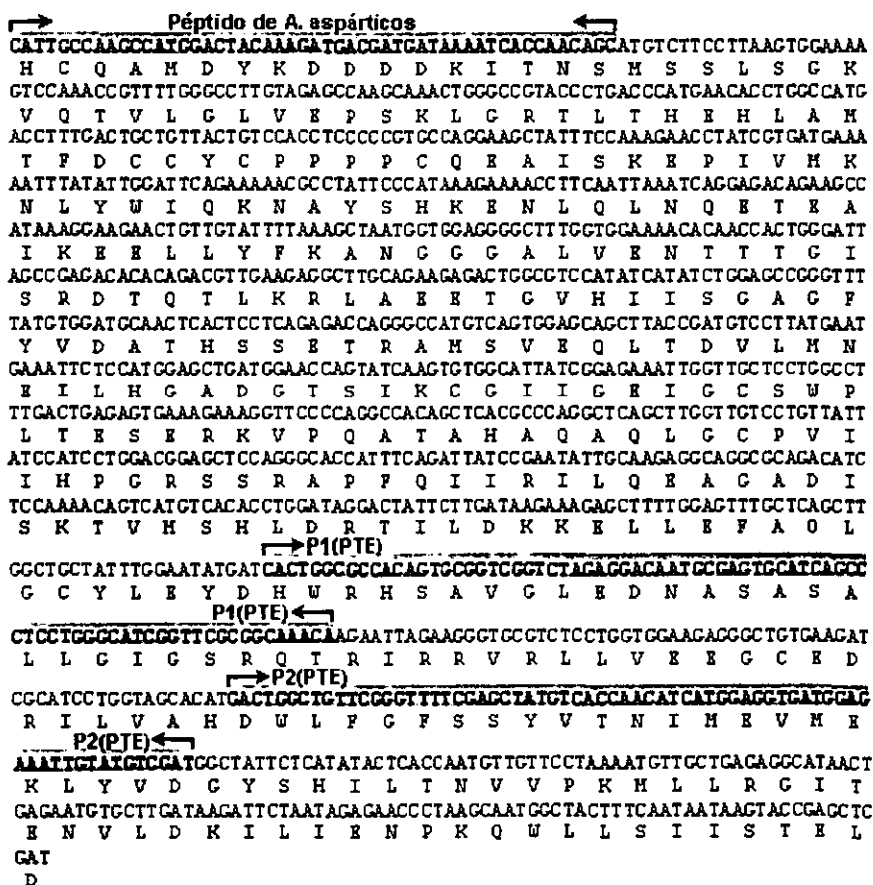


Figura 20. Secuencia de la construcción *hpter(pte)*#64 y su traducción correspondiente. Las flechas indican las asas P1 y P2 intercambiadas así como el péptido en la región 5' del gen.

Para la construcción pGEM - *hpter(pte)* la secuencia sólo difiere en algunas bases de la *hpter* que se usó como molde; de manera que se escogió la clona pGEM-*hpter(pte)*#1 para los pasos posteriores (figura 20). Tampoco para el caso de *ephp(igps)* se encontraron discrepancias entre la secuencia obtenida y la del molde (figura 21). Una vez construida ePHP(IGPS) su trabajo se dejó pendiente para dar prioridad a las construcción ePHP(PTE) y hPTER(PTE), de los cuales ya se cuenta un ensayo de actividad.

```

ATGAGTTTGGATCCGACGGCTTACACCTCGCCCAIAGCCATCTGCCATATTGATCTCTCCGGCTTTAAAAAC
H S F D P T G Y T L A H E H L H I D L S G F K N
AACCTGGACTGCCCGCCITGATCAGTATGCCGTTCATTTGCCAGGAGATGAACGACCTGATGACCCGGCCGGTG
N V D C R L D Q Y A F I C Q E H N D L H T R G V
CGTAATGTGATTGAGATGACCAACCGTTACATGGGGCGCAATGCCAATTTATGCTTGATGTAATGCCCGAG
R N V I E H T N R Y M G R N A Q F M L D V H R E
ACGGGATCAACGTGGTCCCTGTACCGCTTATTACGAGGACCGCTTTTCCCGGAACATGTGCCGACCCGC
T G I N V V A C T G Y Y Q D A F F P E H V A T R
AGCGTCCAGGAACTGCCAGGAGATGCTCGATCAAATGAAACAGCGTATCGATGCCAGCGAGCTGAAAGCC
S V Q E L A Q E M V D E I E Q G I D G T E L K A
GGCATCATCCCGGAGATCCGCCACCAGCGAAGGAAAGATACCGCCGTGGAAGAGAAAGGTATTTATGCCCGCT
G I I A E I G T S E G K I T P L E E K V F I A A
CGCTGCCCGCATAAACAGACCCGACGCCCAGTCTCCACCCATACCTCGTTCCAGCACGATGGCCCTGGAGCAA
A L A H N Q T G R P I S T H T S F S T M G L E Q
CTGCCCTTGCTACAAGCCACGGGTGATCTTTCCGGCGTCCAGCTTGGTCACTCCGATCTGAAAGACCAAC
L A L L Q A H G V D L S R V T V G H C D L K D N

CTCGACAACATTTGAAGATGATCGATCTCGCCCGCTACCTGCAGTTCGACACCAATCCGCAAGCAACGGG
L D N I L K M I D L G A Y V O F D T I G K N S E
TCCGCCATCCGTTATGCGATGCTTCATGCGCTACCGGACCGTGGCTTCTGTAACCCGCGTCATGCTGTCCATG
S G I R I A M L H A L R D R G L L N R V H L S H
P2(IGPS) ←
GATCGCTTTTCGATTCGCTCCGGCTTGAATGCCCGCTCCCATTTAAAAGCCAACGGTGGTTATGCGTATGAC
D G F L I G S A L H A R S H L K A N G C G Y G Y D
TATTTACTAACCACCTTTATTCGCAATTCGCCAGTCAGGATTCAGTCAGCCCGATGTGCGATGTGATGTTA
Y L L T T F I P Q L R Q S G F S Q A D V D V M L
CGTGAATCCCTCTCAATTTTCC
R E N P S Q F F

```

Figura 21. Secuencia obtenida del gen *ephp(igps)* #4.

Clonación y sobreexpresión

La sensibilidad del sistema de tamizado *in vivo* propuesto empleado para este trabajo (ver más adelante) depende directamente de la cantidad de proteína activa en la célula. Por ello, una buena sobreexpresión es esencial si se pretende que dicho sistema de detección de actividad minúscula sea útil.

El plásmido pGEM es un excelente vehículo para la síntesis de RNA *in vitro*, por lo que es muy útil para el sistema de selección *in vitro* *Genescis*. Sin embargo no se logró buena sobreexpresión (figura 22a). Por ello, empleando los oligos BamHIFlag(ePHPrev), BamHIFlag(hPTERrev), NcoI(ePHPfor) y NcoI(hPTERfor) se reclonaron *ephp(pte)* y *hpter(pte)* en el sistema pJB122 y se introdujeron en la cepa C41 de *Escherichia coli*, ya que estos son un mejor sistema para sobreexpresión (figura 22b y c; Miroux y Walker, 1996).

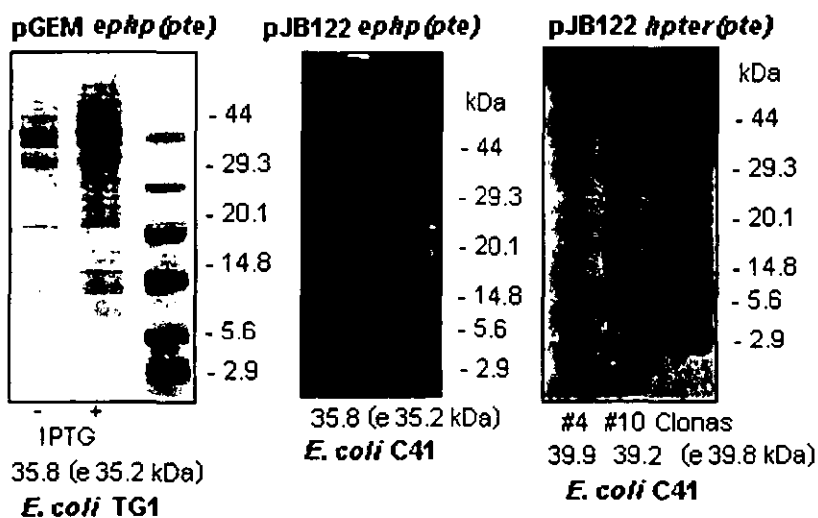


Figura 22. Análisis de sobreexpresión de las construcciones en gel de condiciones desnaturalizantes (poliacrilamida y SDS 20%). En la parte superior se muestra el nombre de construcción y en la inferior el peso obtenido y el esperado, así como la cepa en la que se clonó la construcción.

Aún cuando el sistema pJB122 es muy eficiente para sobreexpresión solamente 1 de 4 colonias lograron tener una sobreexpresión eficiente de ePHP(PTE) y 4 de 10 con la hPTER(PTE).

Diversidad dirigida en las asas P1 y P2

Diseño de oligonucleótidos degenerados

La compleja relación entre la estructura y la función de las proteínas se debe a la intrincada interacción entre los residuos de la cadena polipeptídica. Un ejemplo de la impredecibilidad estructural resulta de la observación de la aparición de mutaciones benéficas para la creación o modificación de la actividad enzimática en residuos no involucrados directamente en el sitio activo (Oue *et al*, 1998). En general, como se ha visto en experimentos de diseño por evolución dirigida, este tipo de mutaciones son prácticamente imposibles de predecir *a priori*. Por ello, en el caso de la búsqueda de actividad de paraoxonasa en los híbridos *ephp(pte)* y *hpter(pte)* se intentó crear una primer biblioteca aprovechando la relativa independencia estructural y funcional de las asas del extremo carboxilo en las estructuras de barril α/β . La diversidad de esta primer biblioteca, generada empleando oligonucleótidos degenerados y partir de los híbridos *ephp(pte)* y *hpter(pte)*, estaría dirigida solamente en las asas P1 y P2 transferidas de la PTE a la PHP.

Para insertar la diversidad en los moldes *hpter(pte)* y *ephp(pte)*, los oligos con las regiones de diversidad se construyeron exactamente como aquéllos empleados en la construcción del molde (ver capítulo V: material y método). Es decir, tanto la región *p1adiv* como *p2adiv* (figura 23) se flanquearon (por separado) en el extremo 5' con una secuencia de 25 bases correspondientes al extremo carboxilo de la β -plegada que precede al asa ($\beta 7$ para P1 y $\beta 8$ para P2); y por el extremo 3' con una secuencia de 25 bases del asa correspondiente en la estructura del asa en la PHP. Las otras regiones, *p1bdiv* y *p2bdiv*, se flanquearon en el extremo 5' por la secuencia que comparten con *p1adiv* y *p2adiv* respectivamente, mientras que en el extremo 3' por 25 bases correspondientes al extremo amino de la α -hélice que las precede. Se realizó este tipo de construcciones para proveer a los oligos regiones de reconocimiento con el molde, para aumentar su probabilidad de integración al gen.

Asa P1

Diversidad	I	P	S	I	L	E	D	N					
Unión al sustrato	CAC	NTN	NTN	CAC	WMY	GCG	NTN	GGT	NTN	GAN	GAN	WMY	CGC
	H		H	A	G							A	
	254		257	259	261							266	

} p1adiv

Diversidad	S	S	L	L	I	R	S	W	Q	T			
Unión al sustrato	WMY	GCA	WYM	GCC	NTN	NTN	GGC	NTN	ARR	WMY	TGG	WMY	WMY
		A	A		G								
		268	270		282								

} p1bdiv

Asa P2

Diversidad		F	G	S	S	V	T	N	I					
Unión al sustrato	GAC	TGG	CTG	NTN	WMY	TTT	WMY	WMY	TAT	NTN	WMY	WMY	NTN	ATG
	D	W	L		F		Y						M	
	301	302	303		306		309						314	

} p2adiv

Diversidad	D	V	D	R	V	N	P	D	
Unión al sustrato	GAN	NTN	ATG	GAN	ARR	NTN	WMY	NTN	GAN
			M						
			317						

} p2bdiv

Figura 23. Zonas de diversidad dirigida en las asas P1 y P2 (divididas en las regiones *p1adiv*, *p1bdiv*, *p2adiv* y *p2bdiv*). Por debajo de la secuencia, los residuos involucrados directamente en la unión del sustrato y por tanto invariantes; por encima de la secuencia, los residuos originales en la PTE y que fueron modificados por codones degenerados. Por debajo de la secuencia, se muestra los residuos

En el diseño de los oligonucleótidos degenerados, los residuos directamente involucrados en la unión del análogo del paraoxón se mantuvieron constantes, mientras que en aquellos sitios donde se insertó la diversidad, ésta respetó la polaridad y carga de los residuos originales (figura 23 y tabla IV). Esto se logró empleado el código que se muestra en el apéndice I. De todos los oligonucleótidos diseñados se sintetizaron también los respectivos oligos reverso y complementarios. De esta forma se crearon los oligos diseñados para *ephp(pte)*: P1aDivFor (ePHP/PTE), P1aDivRev (ePHP/PTE), P1bDivFor (ePHP/PTE), P1bDivRev (ePHP/PTE), P2aDivFor (ePHP/PTE), P2aDivRev (ePHP/PTE), P2bDivFor (ePHP/PTE), P2bDivRev (ePHP/PTE); y para *hpter(pte)*: P1aDivRev(hPTER/PTE), P1aDivFor (hPTER/PTE), P1bDivFor (hPTER/PTE), P1bDivRev(hPTER/PTE), P2aDivFor (hPTER/PTE), P2aDivRev(hPTER/PTE), P2bDivFor (hPTER/PTE), P2bDivRev(hPTER/PTE). La secuencia completa de los oligos se encuentra al final del capítulo V.

Tabla IV. Cálculo del tamaño de la biblioteca según aparición de residuos

Característica	Codón	aa. y probabilidad de aparición	<i>g.l.</i>	<i>No.</i>	<i>G.L.A.</i>
Polar sin carga	WMY	S, N, T, Y = 0.25	4	13	52
No polar	NTN	F = 0.17; L = 0.5 I = 0.25; M = 0.083	4	13	52
Polar (+)	ARR	K, R = 0.5	2	2	4
Polar (-)	GAN	E, D = 0.5	2	5	10
Diversidad	NNY	S = 0.134; F, Y, C, L, P, H, R, N, T, I, V, A,	15	1	15
General		D, G = 0.067; W, E, Q, M, K = 0.0			

g.l. grados de libertad. Código R=A ó G; W=T ó A; M=A ó C; Y=C ó T; N= A, T, G ó C

No. Número de veces que aparece el codón; *G.L.T.* grados de libertad totales por codón (*g. l.* x *No.*)

El número máximo de proteínas mutantes posibles, creadas a partir de los oligonucleótidos degenerados propuestos, es de 1.6×10^6 . Este valor se calcula multiplicando los grados de libertad absolutos por codón (representado por *G.L.A.* en la tabla IV); estos valores que se obtienen a su vez con el producto de los grados de libertad de cada codón (*g.l.*) por su frecuencia absoluta (*No.*). Este tamaño de biblioteca es relativamente pequeño (Griffiths y Tawfik, 2000), sin embargo dado el diseño racional previo probablemente sea suficiente para encontrar clonas positivas.

Por tres caminos diferentes se intentó intercambiar los oligonucleótidos degenerados por las regiones homólogas de los moldes: el primero involucra el protocolo de barajeo de genes (Stemmer, 1994a; Stemmer 1994b); el segundo es una mezcla entre dicho método y una PCR StEP ; y el tercero consiste es una modificación de una PCR StEP (Zhao *et al*, 1998). Para los dos primeros experimentos se emplearon aproximadamente 6µg de cada uno los genes *hpter(pte)* y *ephp(pte)*. Estos se obtuvieron al emplear en una PCR estándar como moldes las construcciones pGEM-*hpter(pte)* y pGEM-*ephp(pte)* y los oligonucleótidos del vector LMB2 y LMB3.

Inserción de oligos mediante barajeo de genes

Como se mencionó durante la introducción, el barajeo de genes consiste en digerir aproximadamente 7 µg de material (por ejemplo, DNA amplificado mediante PCR) y encontrar, mediante un curso en el tiempo, las condiciones en las cuales al menos el 80% el material sea reducido al 10% del tamaño

original del fragmento. Los fragmentos se separan mediante un gel de agarosa y aquella región que muestre el tamaño de interés se extrae (siempre separando del material no digerido). En una primera PCR estos fragmentos purificados se reconstruyen y en una segunda reacción los fragmentos flanqueados por oligos externos (los cuales se agregan a la mezcla de reacción) son amplificados.

Siguiendo este protocolo para la PCR sexual (Stemmer, 1994a; Stemmer 1994b) se introdujeron los oligos diseñados con diversidad durante la reconstrucción del gen (1er. PCR sin oligos externos). Se emplearon diferentes concentraciones de genes fragmentados (15, 10, 5, 1 ng/ μ l) y de oligos con diversidad (0, 1, 2.5 y 5 μ M) en la reconstrucción, con el propósito de aumentar la probabilidad de intercambio entre los oligos generados con las asas correspondientes del molde. Después de varias pruebas modificando la temperatura de empalme en la 1era. y 2da. PCR, así como los tiempos de elongación, se detectó que para poder ensamblar eficientemente el gen (obtener una única banda bien definida en la segunda reacción de PCR; figura 24) deben emplearse oligos anidados en la segunda reacción de PCR (Zhao *et al* , 1998).

La estrategia de los oligonucleótidos anidados consiste en amplificar con oligos del vector (LMB2 y LMB3 para pGEM; y LBRP1-pJB y LBRP2-pJB para pJB122) los genes de interés para el barajeo de genes y para la PCR StEP (oligos A en la figura 20), mientras que en la reconstrucción de estos - segunda PCR de ambos métodos - , se emplean oligos que contienen los sitios restricción y parte de secuencia del gen (oligos B en la figura 20) a unos 15-20 pares de bases de los extremos 5' y 3' del molde (por ejemplo Nflag hPTERFor y KpnI (hPTERRev) para la clonación de *hpter* en pGEM). Esta estrategia se emplea ya que a menudo, durante la reconstrucción de los genes, los fragmentos de los extremos pueden no integrarse al gen ensamblado, perdiendo así los sitios de unión a los oligos los externos. En el resto de los experimentos también se emplearon oligonucleótidos anidados.

Con el fin de encontrar una proporción entre la cantidad de molde (en este caso material digerido con Dnasa I) y los oligonucleótidos degenerados se planearon dos series de experimentos. Primero se mantuvo constante la concentración de oligos con diversidad (2.5 μM) durante la 1era. PCR y se varió la cantidad de gen fragmentado (figura 24). Los resultados muestran que se requiere al menos una concentración de 1 ng/ μl de material, en las condiciones en las que se realizó el experimento, para poder reconstruir el gen. La secuencia de la región 3' de gen muestra que no insertó la diversidad dirigida, sin embargo aparecieron mutaciones aleatorias producto de la reconstrucción de un solo gen durante la PCR sexual (tabla V).

Posteriormente se fijó la concentración de DNA fragmentado en 5 ng/ μl y probaron diferentes concentraciones de oligonucleótidos (figura 25). No pudieron ser reconstruidos los genes en presencia de 5 μM de oligonucleótidos, probablemente esto se deba a que a partir de esa concentración, los oligos interfieren en el proceso de reconstrucción del gen.

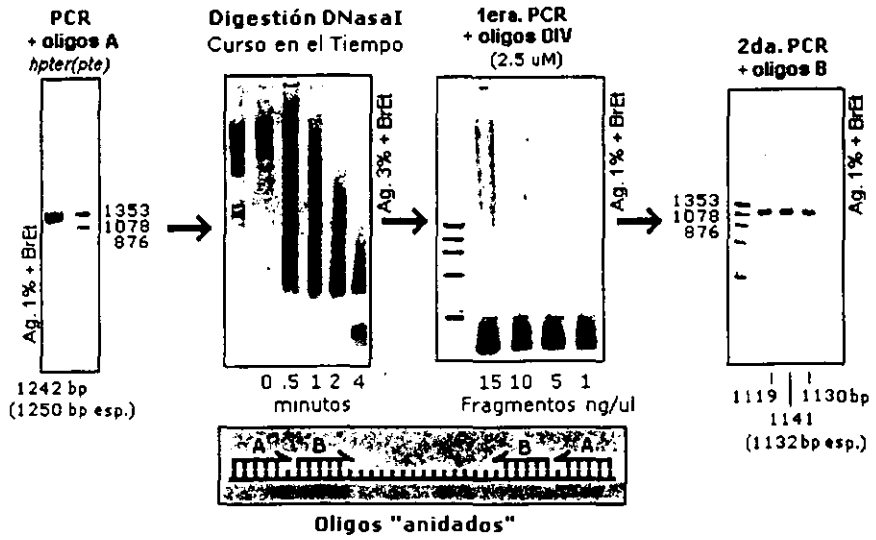


Figura 24. Introducción de la diversidad empleando barajeo de genes.

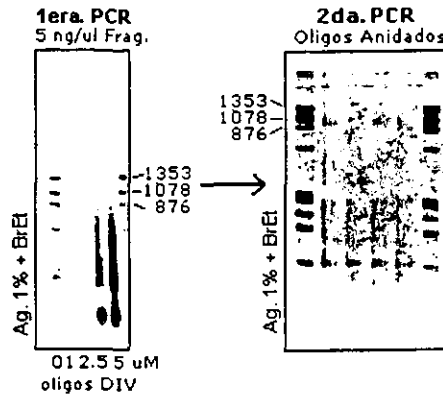


Figura 25. Reconstrucción de la *hpter(pte)* variando la concentración de oligos con diversidad.

Se realizaron experimentos similares empleando como molde los genes originales ePHP y hPTER con el fin de encontrar condiciones que permitan hacer construcciones únicamente enriqueciendo las zonas de interés con oligonucleótidos durante la recombinación *in vitro*. En este caso los genes ensamblados no poseían y los fragmentos correspondientes a las asas P1 y P2 de la PTE (datos no mostrados).

Inserción de oligos mediante PCR StEP con fragmentos digeridos

La segunda estrategia para la inserción de la diversidad emplea como molde los fragmentos digeridos de *hpte(pte)* y *eph(pte)*, los cuales se reconstruyen mediante una PCR StEP (Zhao *et al*, 1998) en presencia de diferentes concentraciones de oligos degenerados. La PCR StEP consiste en una primera PCR con ciclos cortos de desnaturalización y empalme, empleando como molde DNA metilado. Posteriormente se elimina el DNA metilado mediante una digestión usando *DpnI*. El producto de esta digestión se somete a una segunda PCR donde los genes ensamblados son amplificados usando oligos que reconocen los extremos 5' y 3' del gen original.

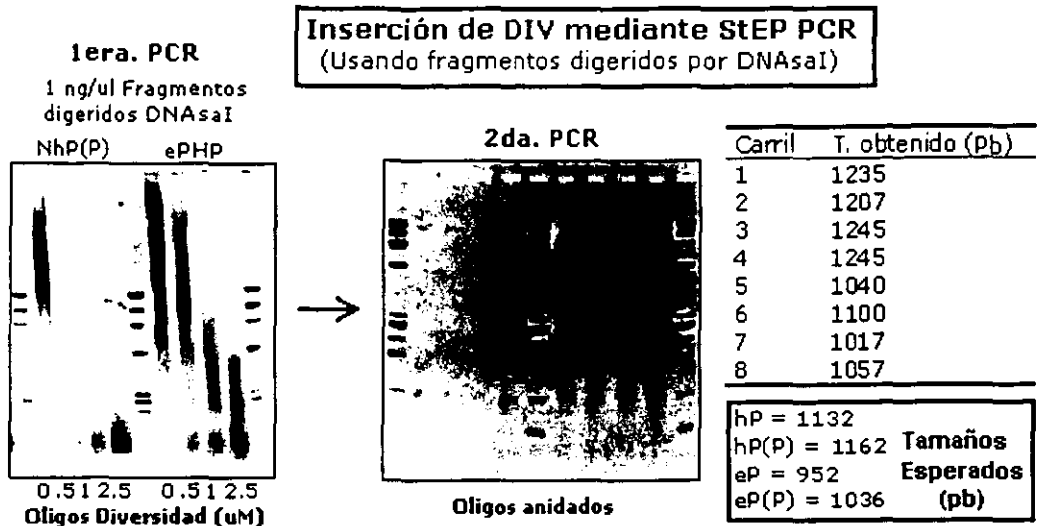


Figura 26. Inserción de la diversidad empleando fragmentos digeridos por Dnasa I De *hpter(pte)* y *ephp(pte)* como moldes para el protocolo de una PCR StEP.

Este procedimiento, que emplea como molde los fragmentos digeridos por Dnasa I, se propuso ya que tanto el gen *hpter* como la construcción *hpter(pte)* no son eficientemente digeridos por la enzima *DpnI* (figura 26).

Desafortunadamente no se cuenta con la secuencia de los genes obtenidos ya que no se pudo eliminar el barrido de la reconstrucción lo que, parece ser, interfería durante la determinación de la misma.

Inserción de oligos mediante PCR StEP

La tercer estrategia para insertar la diversidad fue mediante el uso de la PCR StEP en presencia de los oligonucleótidos degenerados. Para el caso de *ephp(pte)* se emplearon como moldes metilaciones *in vitro* de *ephp(pte)* amplificado mediante PCR, el plásmido pJE122 - *ephp(pte)*, y el plásmido pGEM - *ephp* (ambos extraídos de las cepas C41 y TG1 de *Escherichia coli* respectivamente); para cada molde se varió la concentración de oligos de diversidad. Sólo cuando se empleó como molde pGEM - *ephp* se logró reconstruir un gen, sin embargo en este caso se trató del mismo *ephp* (figura 27).

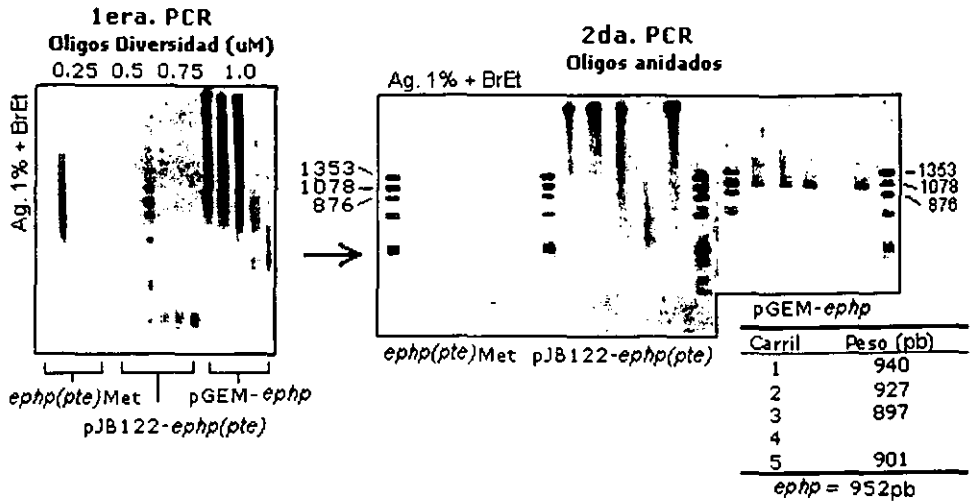


Figura 27. Inserción de la diversidad empleando una reacción de PCR StEP. Los moldes empleados fueron *ephp(pte)* metilado *in vitro* con *DamI*, y los plásmidos pJB122-*ephp(pte)* y eJB122-*ephp(pte)*.

Tabla V. Resultados de inserción de oligos degenerados

Método	Molde / (ng/μl)	Oligos DIV μM	Resultados
PCR Sexual	<i>hp(p)</i> ¹ / 15, 10,5,1	5	<i>hp(p)</i> . M.I.D.n.D
PCR Sexual	<i>hp(p)</i> / 5	0, 1, 2.5,5	2 Sin señal en secuencia y <i>hp(P)</i> M.I.D.n.D. ²
PCR	<i>hp(p)</i>	0, 0.5, 1, 2.5	No se cuenta con sec. pero los pesos indican moldes.
Sex./StEP	<i>ePHP</i>		
StEP	<i>ep(p)</i> Metilado <i>in vitro</i>	0,0.25, 0.5, 0.75, 1.0	Peso corresponde a <i>eP</i> , el resto no se ensambló.
	pJB122 - <i>ep(p)</i>		
	pGEM - <i>ephp</i>		

¹ *hp(P)* = *hpter(pte)*; *eP(P)* = *ephp(pte)*.

² M.I.D.n.D= Mutaciones, Inserciones o deleciones fuera del área de diversidad.

A pesar de que se siguieron tres estrategias, con diferentes condiciones cada una, no fue posible insertar los oligonucleótidos degenerados durante la reconstrucción de los genes (en la tabla V se resumen los resultados obtenidos en cada caso). Debido a esto no fue posible crear las bibliotecas con la diversidad dirigida propuesta.

Inserción de diversidad durante construcción

Como ejercicio para observar el comportamiento de la diversidad en el empleo de oligos degenerados para construir "manualmente" híbridos, se realizó el siguiente experimento.

Empleando los oligos de diversidad P1aDivRev (ePHP/PTE) y P1aDivFor (ePHP/PTE) (correspondientes a la primera sección del asa P1) en una PCR de traslape (figura 28), se insertaron directamente los sitios de diversidad en el gen *ephp* junto con el fragmento de dicha asa. Se mandó secuenciar el resultado de dicha construcción. Analizando el cromatograma obtenido (datos no mostrados), se observó que en general existe una tendencia (tabla VI) a la aparición de adeninas y timinas.

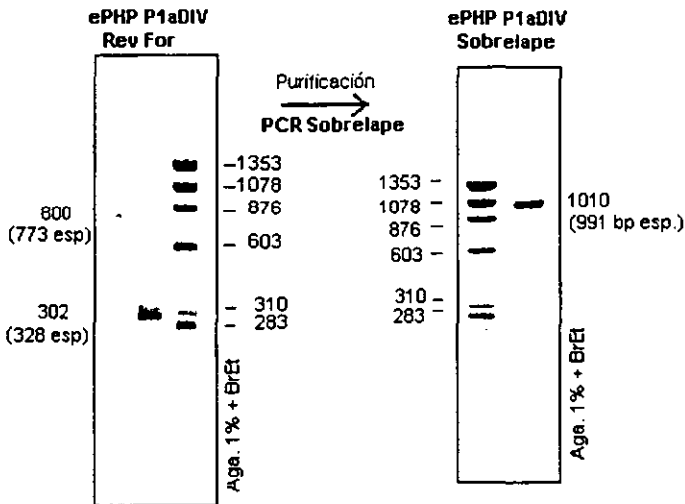


Figura 28. Construcción de *ephp P1aDiv* mediante una PCR de traslape.

Tabla VI. Resultados del análisis cuantitativo del cromatograma en la construcción de *ephp p1adiv*.

Esperado	Secuencia obtenida
R (A o G)	Aprox. A = 0.5 G = 0.5
W (T o A)	Aprox. A = 0.75 T = 0.25
K (G o T)	Aprox. T = 0.75 G = 0.25
N (A, G, T o C)	A y T ligeramente mayor

Esto demuestra que aun cuando es posible insertar diversidad durante el proceso de construcción de híbridos, la reactividad diferencial de las bases puede ser sesgar las bibliotecas hacia cierta región del espacio de secuencias, abatiendo así la eficiencia de la búsqueda (Gaytán *et al* 2001).

Sistemas de selección

Se estudiaron tres estrategias diferentes como posibles sistemas de selección para buscar el gen con actividad de paraoxonasa de las bibliotecas generadas a partir de los híbridos *hpter(pte)* y *ephp(pte)*.

Por un lado, se intentaron encontrar condiciones en las que la presencia de actividad de fosfotriesterasa confiriera ventajas de crecimiento o sobrevivencia a la clona que la poseyera para establecer **(a)** un sistema de selección *in vivo*. Por otro lado, se montó un sistema de **(b)** tamizado *in vivo* que consiste en incubar las clonas con posible actividad en presencia de paraoxón, mientras que la reacción se sigue a través de la aparición de *p*-nitrofenol (producto de la hidrólisis del paraoxón). En el sistema de tamizado *in vivo* el tamaño de biblioteca es un factor crítico, ya que para someter las clonas al ensayo estas deben de ser seleccionadas manualmente. Este factor limitante puede ser salvado por la combinación entre diseño racional y evolución dirigida, lo cual permite crear bibliotecas muy específicas (*bibliotecas inteligentes*).

Las técnicas de selección *in vivo* son sistemas eficientes y técnicamente sencillos, sin embargo su aplicación general como sistemas de selección se encuentra limitada principalmente por los métodos actuales de transformación – que restringen el tamaño de las bibliotecas a 10^6 - 10^8 variantes – y debido a que algunas reacciones – especialmente aquellas involucradas con la creación de nuevas actividades – no pueden llevarse a cabo en el ambiente celular (Griffiths y Tawfik, 2000). Debido a esto, se desarrolló un método de **(c)** selección *in vitro* en colaboración con los

doctores Andrew Griffiths⁶ y Dan Tawfik⁷ que permitiera contar con una selección rigurosa que brinde flexibilidad en cuanto al tamaño (hasta 10¹⁰ genes por mililitro).

Selección *in vivo*

La aparición de la actividad de fosfotriesterasa en la naturaleza sugiere que posiblemente puedan reproducirse, hasta cierto punto, las condiciones en las que se dio esta selección *in vivo* en la bacterias. Aun cuando las bacterias de vida libre, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* poseen metabolismos diferentes a *Escherichia coli*, tal vez la actividad de paraoxonasa confiera una ventaja sobre aquellas clonas de *E. coli* que la posean si se encuentran las condiciones necesarias para ello. Por ello, el primer sistema de selección propuesto fue hacer crecer las cepas *Escherichia coli* TG1 pGEM – *pte* y *E. coli* TG1 pGEM – *ephp* y *E. coli* TG1 pGEM – *hpter* en presencia de paraoxón para observar si la actividad de fosfotriesterasa confería alguna ventaja de sobrevivencia o crecimiento a la cepa que la portara.

Se probaron diferentes condiciones como variaciones en la temperatura de crecimiento (25° , 30° y 40° C), cantidad inicial de bacterias (D.O.₆₀₀ = 0.005, 0.01, 0.05 y 0.1) y concentración de paraoxón (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 y 4.4 mM), con el fin de encontrar condiciones donde el crecimiento fuera favorable en aquellos organismos con la actividad de fosfotriesterasa.

Los resultados muestran que en ninguna de las condiciones probadas existen diferencias significativas entre el crecimiento en presencia de paraoxón (relativo al crecimiento de cada cepa en ausencia de este compuesto) entre las cepas con actividad de paraoxonasa y aquellas que no la tienen (figura 29).

⁶ MRC- Laboratory of Molecular Biology, Hills Rd., Cambridge, CB2 2QH, UK. griff@mrc-lmb.cam.ac.uk

⁷ MRC- Centre for Protein Engineering, Hills Rd., Cambridge, CB2 2QH, UK. dstf@mrc-lmb.cam.ac.uk

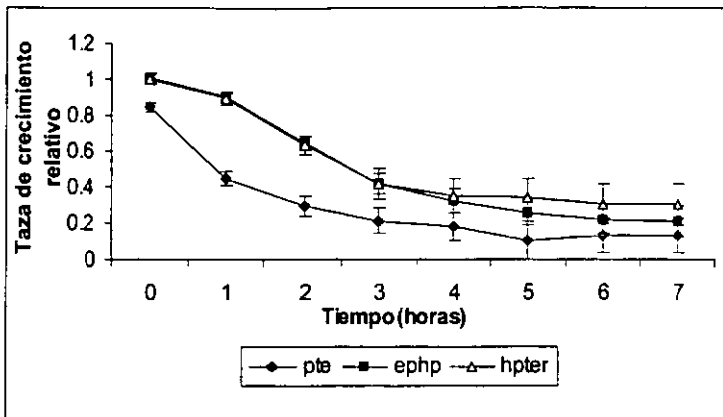


Figura 29. La presencia de actividad de fosfotriesterasa en la cepa TG1 de *Escherichia coli* no confiere ninguna ventaja en el crecimiento relativo - proporción entre el crecimiento ($D.O_{600}$) en presencia de 4.4 mM de paraoxón y en ausencia de este compuesto a 37 ° C - de las células.

Este ensayo depende de la tasa de difusión del paraoxón a través de la membrana plasmática. Por ello, se clonó la fosfotriesterasa con su péptido líder, en el plásmido pCE820 empleando los oligonucleótidos Opdrev y pte-sp. La cepa de TG1 de *Escherichia coli* se transformó con este nuevo plásmido. La secuencia del gen (*ptep*) fue confirmada por secuencia empleando los oligos PB78 y PB79 del vector. En un ensayo de actividad *in vivo* (descrito más adelante) se obtuvo que la cepa transformada con la fosfotriesterasa con péptido líder tenía menos del 10% de actividad (V_{max}) que la fosfotriesterasa (figura 31). En la extracción de periplasma solamente se encontraron trazas de actividad. Probablemente el péptido líder interfiera con el plegamiento de la proteína o haga más inestable al mRNA en el ambiente celular.

Tamizado *in vivo*

El protocolo consiste en inocular una clona en medio rico 2xTY con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y se crece a 37° C. Los cultivos se inducen con IPTG y se dejan creciendo durante 8-24 horas a 30° C. Los cultivos se llevan a una $O.D._{600} = 0.1$ y se dispensan en una microplaca de 96 pozos junto con ZnCl_2

y NaHCO_3 (necesarios para la reactivación del centro de metales y carbamilación de la lisina 169, en el caso de la PTE). La reacción se sigue midiendo la aparición de *p*-nitrofenol (Abs. a 405 nm).

Para cuantificar la sensibilidad de este método se hicieron diluciones sucesivas de un cultivo de TG1 *E. coli* pGEM - *pte* en un cultivo de TG1 *E. coli* pGEM - *ephp*, de tal forma que la actividad de PTE se fuera diluyendo en la ausencia de actividad de la ePHP. Con este experimento se mostró que siguiendo la reacción durante 2 horas, y comparando las pendientes de la cinética obtenida (V_{\max}), puede distinguirse actividad hasta en una dilución de actividad 1:10⁵ (figura 30).

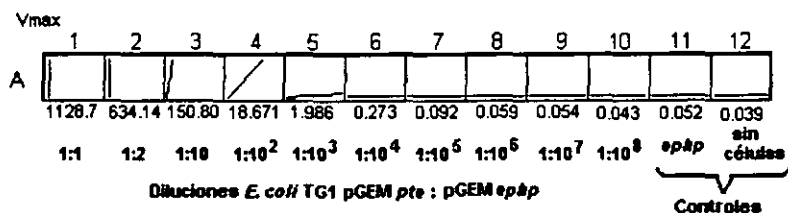


Figura 30. Sensibilidad del tamizado *in vivo* a 37°C durante 2 horas

Se sometieron al examen de actividad *in vivo* las construcciones de pGEM - *hpter(pte)* # 1 y pGEM - *ephp(pte)mut* # 1, pero no se les detectó actividad paraoxonasa, por lo que éstas deben de ser por lo menos 10⁵ veces menos activas que la PTE (figura 31).

La sensibilidad de este sistema de detección depende directamente en la cantidad de enzima activa, la cual es proporcional a su vez del nivel de sobreexpresión de la proteína recombinante. En el sistema de sobreexpresión pJB122 se logró tener una mejor sobreexpresión en algunas clonas en relación con el sistema pGEM. Sin embargo, no se realizaron experimentos de cuantificación de sensibilidad y los ensayos de actividad con pBJ122-*hpter(pte)*#64 y pBJ122-*ephp(pte)* no han sido concluyentes.

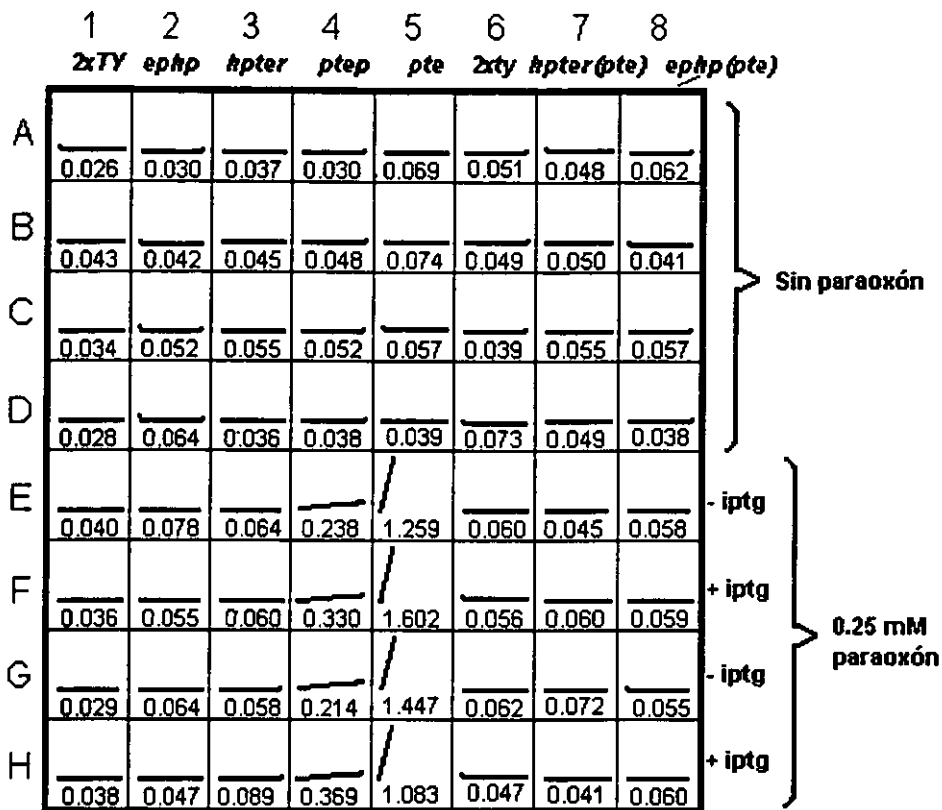


Figura 31. Seguimiento de la hidrólisis de paraoxón a 405 nm. 50 ml de cultivo de TG1 pGEM con varios insertos (parte superior de cuadro) fueron incubados en presencia de 0.25 mM de paraoxón, ZnCl₂ 1 mM y NaHCO₃ 10 mM. Los datos se muestran en forma gráfica y numérica (Vmax). Como controles se tienen repeticiones en ausencia de paraoxón y en ausencia del cultivo (únicamente medio 2xTY).

Selección *in vitro*

Como se mencionó en el primer capítulo, el sistema *Genescis* (Griffiths y Tawfik, 1998) consiste en una compartimentalización de bibliotecas empleando una emulsión agua/aceite. Los genes de la biblioteca se encuentran biotilados y las proteínas codificadas a partir de estos contienen un péptido en el extremo amino. Dentro de cada compartimento existen microesferas cubiertas por avidina y por anticuerpos que reconocen dicho

péptido, de tal forma que la transcripción y traducción de estos genes en las gotas de agua llevan a la formación de complejos de genes y varias copias de las proteínas que estos codifican, ambos unidos a las microesferas. La emulsión se rompe y el amortiguador de transcripción/traducción *in vitro* se recambia por aquel necesario para la actividad de las proteínas.

En colaboración con el Dr. Tawfik, se realizaron simulaciones de traducción *in vitro* para determinar las concentraciones que permiten una detección eficiente de actividad – variando tipo de metales, $ZnCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$ así como su concentración. De estos experimentos se concluyó que de $CoCl_2$ 0.1 mM y $NaHCO_3$ 10 mM, agregados después de la traducción, eran las mejores condiciones para detectar actividad de fosfotriesterasa.

Debido a que el paraoxón es relativamente inestable ($k_{obs} \approx 10^{-7} s^{-1}$ a 25°C y pH 8. Shim, 1998) y dada la poca proteína activa por compartimento (por la baja concentración de DNA, aprox. 1 nM) el ruido generado por la hidrólisis espontánea de paraoxón interfiere con la detección de fosfotriesterasa. El Dr. Dan Twafik y el Químico Luis Olgin⁸ trabajaron en la síntesis de compuestos más estables que permitirían aumentar la sensibilidad del *Genescis*. Este trabajo de colaboración ha permitido obtener un sistema *Genescis* capaz de detectar actividad de fosfotriesterasa de hasta 10^{-6} veces menor a la actividad de fosfotriesterasa bacteriana.

⁸ Facultad de Química. UNAM. Ciudad de México 04510. MÉXICO. luisolgin@yahoo.com

Capítulo IV: Discusión y conclusiones

El análisis estructural de la fosfotriesterasa mostró que los residuos directamente involucrados con la unión al sustrato se encuentran en las asas $\beta 2 \alpha 2$, $\beta 3 \alpha 3$, $\beta 7 \alpha 7$ y $\beta 8 \alpha 8$ que unen el extremo carboxilo de la β -plegada con la α -hélice que la procede. Mientras que aquellos residuos involucrados directamente en el mecanismo catalítico se localizan en la base de las asas $\beta 1 \alpha 1$, $\beta 4 \alpha 4$, $\beta 5 \alpha 5$, $\beta 6 \alpha 6$ y $\beta 8 \alpha 8$. Esta distribución es congruente con la clasificación general de los barriles $\alpha\beta$ propuesta por Altamirano y Fersht (2000b). Más aún, tanto la fosfotriesterasa como las proteínas homólogas a la fosfotriesterasa de *E. coli* y de humano, al poseer un extremo N' terminal y una asa $\beta 1 \alpha 1$ prominente así como ausencia de los patrones de glicinas en el asa $\beta 6 \alpha 6$, pertenecen a la Clase II de dicha clasificación.

Construcción de los híbridos ePHP(PTE) y hPTER(PTE)

A excepción de los residuos I106, W131 y F132 que encuentran en las asas $\beta 2 \alpha 2$ y $\beta 3 \alpha 3$, los residuos involucrados directamente en unión al sustrato en la PTE forman parte de las asas $\beta 7 \alpha 7$ y $\beta 8 \alpha 8$. Con el propósito de conferir actividad de fosfotriesterasa a sus proteínas homólogas en *Escherichia coli* y humano, se trasplantaron las asas $\beta 7 \alpha 7$ y $\beta 8 \alpha 8$ de la PTE (llamadas P1 y P2 respectivamente) a las regiones homólogas en las PHP.

Con el sistema de tamizado *in vivo*, que permite detectar actividades de paraoxonasa hasta 10^5 - 10^6 veces menores a actividad de PTE nativa, no se observó actividad en las clonas *Escherichia coli* TG1 pGEM *ephp(pte)* y *Escherichia coli* TG1 pGEM *hpter(pte)*. Dado que se carece de estudios cinéticos y cristalográficos con los híbridos ePHP(PTE) y hPTER(PTE) puros, no puede valorarse de que forma la inserción de las asas P1 y P2 de PTE modifican la estructura y función en las PHP.

Como trabajos subsecuentes al presente, se propone realizar experimentos cinéticos y cristalográficos de los híbridos ePHP(PTE) y

hPTER(PTE), así como estudiar nuevos diseños posibles como la inserción de las asas $\beta 1 \alpha 1$, $\beta 2 \alpha 2$ y/o $\beta 3 \alpha 3$ de la PTE en las PHP. Esto con el fin de entender la forma en que la inserción de las asas P1 y P2 de PTE modifican la estructura y función en las PHP.

Diversidad dirigida

En cuanto a la introducción de la diversidad dirigida, a pesar de que se probaron diferentes estrategias y diversas condiciones en cada una de ellas, no fue posible insertar las regiones de diversidad de los oligonucleótidos en las construcciones *hpter(pte)* y *ephp(pte)*.

El tamaño de los fragmentos (así como la cantidad) es crítico para reconstrucción apropiada de los genes durante la recombinación por PCR sexual. Debido a esto, y como parte de la continuación del presente trabajo, se propone realizar experimentos en los cuales se varíe la longitud de los oligonucleótidos que contienen la diversidad con el fin de obtener las bibliotecas que se someterán a los métodos de selección de fosfotriesterasa (ver capítulo V). Aun cuando la diversidad dirigida puede integrarse durante la construcción de los híbridos como se verá más adelante, resulta atractivo encontrar condiciones en las que fragmentos tan grandes de diversidad puedan insertarse "automáticamente" en genes de interés. No sólo por la utilidad misma de la diversidad, sino como un paso hacia la construcción automatizada de híbridos como son *hpter(pte)* y *ephp(pte)*.

Se han previsto construcciones y experimentos posteriores para la interconversión de otros miembros de la superfamilia de las hidrolasas dependientes de metal como conferir actividad de adenosina deaminasa a la PTE y la ePHP. En estas nuevas construcciones se propone emplear oligos degenerados para la introducción de diversidad, simultáneamente a la creación de los híbridos, con la precaución de valorar el sesgo resultante de la reactividad diferencial de las bases.

Sistemas de selección

En los experimentos de selección *in vivo* la presencia de paraoxón inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* TG1 independientemente de la presencia de actividad de fosfotriesterasa. Probablemente esto se deba a que los compuestos resultantes de la hidrólisis de paraoxón (el *p*-nitrofenol y el dietil-fosfato) sean también tóxicos para las células.

A pesar de no contar con un método de selección *in vivo*, el sistema de detección de actividad de fosfotriesterasa *in vivo* permite encontrar mutantes de hasta 10^{-6} veces menos activas que la PTE. A pesar de que las PTE y las PHP no comparten ligandos (a diferencia de la PRAI y la IGPS en Altamirano *et al*, 2000a), el diseño racional debe permitir dicha sensibilidad del tamizado *in vivo*, que junto con algún sistema automatizado de selección, debería ser suficiente para encontrar una clona activa una vez diseñada la biblioteca con diversidad.

Además de contar con el tamizado *in vivo*, la colaboración con el equipo de trabajo de Griffiths y Tawfik, permitió montar el sistema *Genescis* para la selección *in vitro* de fosfotriesterasas. Este sistema puede detectar y seleccionar clonas hasta 10^5 veces menos activas a la PTE.

Aun cuando el objetivo general del trabajo no se cumplió cabalmente, se lograron avances importantes en el establecimiento de los sistemas de selección y construcción de los híbridos ePHP(PTE) y hPTER(PTE).

Perspectivas

Se ha mencionado que la aparición de la fosfotriesterasa bacteriana replantea la concepción de tiempo necesario para adaptación molecular (Scanlan y Reid, 1995; O' Brien y Herschlag, 1999). Sin embargo, para que el caso de la PTE se convierta en uno de los nuevos paradigmas de evolución molecular en forma concluyente, debe de encontrarse el enzima que le dio origen; de modo que se puedan cuantificar las modificaciones que debió

sufrir dicha enzima para presentar actividad de paraoxonasa, ya que a pesar de que la aparición de compuestos organofosforados como gases nerviosos e insecticidas es relativamente reciente (básicamente desde la Segunda Guerra Mundial), la historia de los compuestos organofosforados debe ser extremadamente antigua. Por ejemplo, las neurotoxinas producidas por la cianobacteria, *Anabaena flos-aquae*, tal como la anatoxina, son potentes inhibidores de colinesterasas (La Du *et al*, 1999).

No sólo el origen de la PTE de *Pseudomonas diminuta* y *Flavobacterium* es un interesante caso de estudio para comprender la evolución de molecular, sino también lo es su promiscuidad catalítica (Jeffery, 1999), debido a que ésta podría ser parte de un proceso incipiente de divergencia evolutiva (O' Brien y Herschlag, 1999) que potencialmente puede ser aprovechado con fines de aplicación biotecnológica como agente para bioremediación de pesticidas organofosforados y en la destoxificación de gases nerviosos y algunos productos empleados en la guerra química.

Con el fin de expandir el espectro de aplicaciones biotecnológicas de la PTE se proponen trabajos subsecuentes que modifiquen (1) la especificidad hacia diferentes sustratos, incluyendo su selectividad estereoquímica, y (2) su desempeño en condiciones extremas, tales como pHs ácidos.

Modificación de selectividad

Se ha demostrado en investigaciones recientes sobre la especificidad estereoquímica y de sustratos para la PTE que el sitio activo de esta enzima puede acomodar una gran variedad de sustituyentes unidos al centro fósforil (Hong y Raushel, 1999). Cualquier combinación de grupos metilo, etilo, isopropilo o fenilo es tolerada en una biblioteca de sustratos teniendo como grupo saliente al *p*-nitrofenilato. A pesar de esto, la fosfotriesterasa muestra una marcada preferencia por un estereoisómero sobre el otro (Hong y Raushel, 1999).

Experimentos de mutaciones puntuales en los residuos directamente involucrados en la unión sustrato de PTE han demostrado que es posible modificar hasta cierto punto la especificidad, tanto de diferentes sustratos como estereoquímica, de dicha enzima (Di Sioudi *et al* 1999; Chen-Goodspeed *et al*, 2001). Como parte de los trabajos posteriores al actual se propone la creación de *bibliotecas inteligentes* en combinación con técnicas de evolución dirigida que permitan la creación de PTE mutantes que hidrolicen eficientemente diversos compuestos organofosforados.

Bioacumulación

Los beneficios del empleo de pesticidas organofosforados se encuentra eclipsado por su elevado costo ambiental y su toxicidad para el hombre. Uno de los problemas ecológicos más comunes es la contaminación por este tipo de pesticidas, su persistencia y bioacumulación (Freedman, 1989).

Aun cuando existe una gran cantidad de evidencia en torno a la toxicidad de los insecticidas organofosforados, estos se emplean con gran frecuencia y abundancia en América Latina debido a su bajo costo (OMS, 1993). Estudios en la presa Ignacio Ramírez, la cual forma parte del sistema hidrológico Lerma-Chapala de la Meseta Central de México, han demostrado que el pesticida metil paratión y el metabolito *p*-nitrofenol se acumulan en los sedimentos y en tejidos de algunos organismos que habitan dentro de la presa (de la Vega-Salazar, 1997a; de la Vega-Salazar, 1997b). La acumulación de casi 2 órdenes de magnitud en los sedimentos se debe, sugieren los autores, a la poca penetración de luz, la composición química y al pH relativamente ácido (6.4). El rediseño de la PTE que le permita degradar eficientemente el metil paratión bajo estas condiciones fisicoquímicas es un ejemplo de algunas de las necesidades que se deben enfrentar si se pretenden emplear a la fosfotriesterasa directamente como agente de biorremediación.

Las paraoxonasas de suero humano

Tanto con humanos como en ratones, la familia PON está constituida por tres genes (*pon1*, *pon2* y *pon3*), los cuales se localizan muy cerca uno del otro en el mismo cromosoma (el 7 en humanos y el 6 en ratones). Esta familia de paraoxonasas parece no estar relacionada con las colinesterasas ni con la familia de las fosfotriesterasas bacterianas.

La enzima PON1 es un componente esencial del complejo de Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL), y es capaz de inactivar compuestos tóxicos resultantes de la oxidación de los compuestos lípidos de las Lipoproteínas de Baja Densidad en la sangre. PON1 también protege contra endotoxinas bacterianas (como algunos lipopolisacáridos) y se presume que también se encuentra asociada con la protección contra aterosclerosis (La Du *et al*, 1999).

La función protectora de PON1 que más se ha estudiado ha sido su habilidad para hidrolizar compuestos organofosforados empleados como insecticidas o agentes nerviosos. Sin embargo, las eficiencias de las paraoxonasas de mamíferos son bastante limitadas tanto por sus afinidades como por sus tasas de conversión. Por ello, la actividad de estas enzimas no son suficientes para proteger en la exposición aguda a compuestos organofosforados. Un parte interesante de trabajos posteriores están dirigidos al eventual uso de la hPTE(PTE) como posible agente en la detoxificación de compuestos organofosforados.

Capítulo V: Material y Método.

Reactivos

Los oligonucleótidos se ordenaron a VHBio o fueron sintetizados en el Laboratory of Molecular Biology, MRC Centre, Cambridge. El isopropil - β -D-tiogalactosido (IPTG) se compró de Laboratorios Melford Ltd. Los geles de poliacrilamida con sulfato dodecil de sodio (SDS) y los marcadores moleculares preteñidos fueron de Pharmacia Biotech (St. Albans, Reino Unido). Todas las enzimas de restricción se obtuvieron de New England BioLabs Inc., Reino Unido. La DNA ligasa T4 y amortiguadores correspondientes fueron de Promega Ltd. (Southampton, R.U) así como sistema de Traducción *in vitro* S-30 para moldes lineares. El paraoxón y la DNAsa I se compraron de la compañía Sigma-Aldrich Company (Poole, R.U.). La S-adenosil metionina y la RNA polimerasa T7 empleados en los experimentos de transcripción/traducción *in vitro*, fueron cortesía del Dr. Dan Tawfik. Los kits de extracción de gel y purificación de PCR fueron proveídos por Qiagen.

Medio de cultivo

La composición del medio rico de cultivo (2xTY) fue 1.6% Bacto- triptófano, 1.0% Extracto de levadura y 0.5 % de NaCl en agua destilada. El medio mínimo (5xM9) contenía 30 g Na₂HPO₄, 15 g KH₂PO₄, 5 g NH₄Cl, 2.5 g NaCl en un litro de agua destilada.

Las cepas de bacterias y plásmidos

Las cepas empleadas fueron *Escherichia coli* TG1^{fr} y *E.coli* C41, mientras que se usaron los plásmidos pGEM-4z, pCE820 y pJB122 (Tabla VIII).

Tabla VIII: Cepas y plásmidos empleados

Cepas	Genotipo	Plásmidos	Fenotipo
TG1 ^{fr}	[K12, (Δ lac -pro), sup E, thi, hsd D5/F' tra D36, pro A ⁺ B ⁺ , lac I ^q , lac Z Δ M15]	PGEM-4Z pJB122	Amp ^r Amp ^r
C41	Derivado de la cepa BL21, no se cuenta con su caracterización genética.	pCE820	Amp ^r

Extracción de plásmidos

La extracción de plásmidos se empleó el kit Qiagen Miniprep Spin siguiendo las instrucciones de dicho proveedor.

Electroforesis de geles de agarosa

Estos (0.8%, 1%, 1.5%) se prepararon con agarosa de alto punto de fusión (BioGene, Kimbolton, R. U.) en un amortiguador 1xTBE con bromuro de etidio. Las muestras se mezclaron con el amortiguador 1/6 (0.25% azul de bromofenol, 0.25% cianol de zileno y 40% sacarosa en agua destilada) y se corrieron en un tanque con amortiguador 1xTBE.

Extracción de DNA del gel agarosa

Fragmentos de DNA fueron extraídos de la agarosa empleando el kit de Extracción de Qiagen y siguiendo el protocolo del proveedor.

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA, así como la construcción y reconstrucción de genes, se realizaron empleando diferentes tipos de Reacción en Cadena de Polimerasa o PCR (Mullis and Falloma, 1987; Saiki *et al*, 1988). En general, la mezcla de reacción para la PCR que contiene 2.5 unidades por 50 μ l SuperTaq (HT BIOTECHNOLOGY LTD) y el amortiguador proveído (50 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100) y 0.25 μ M de desoxinucleótidos o dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech Inc). Los factores que variaban según el tipo de PCR se que se trate

fueron (1) concentración y número de oligonucleótidos; (2) concentración y número de fragmentos molde; y (3) el programa del termociclador.

PCR estándar

Para amplificar un fragmento de DNA en general se utilizó 0.5 μ M de oligonucleótidos y las concentraciones de los moldes variaban entre 0.1 y 10 ng/ μ l. El programa empleado en un termociclador PTC-200 (DNA Engine, MJ Research) repite 25 veces: 94° C x 1 min. (desnaturalización), 55° C x 1 min. (empalme) y 72° C por 1 min. (extensión); con una extensión final de 72° C x 7 min.

PCR traslape

Las condiciones fueron las mismas que en una PCR estándar, con la salvedad que las temperaturas de empalme variaban generalmente entre 55°C y 65°C - dependientes del tamaño de la zona de traslape. Para encontrar la temperatura adecuada de empalme se empleó un termociclador de gradiente Mastercycler® gradient (Eppendoff, Hamburgo, Alemania). Los concentraciones de los fragmentos a empalmar variaban entre 1 y 10 ng/ μ l.

PCR de tamizado

Una clona se selecciona con un palillo estéril de madera y éste se "remoja" en una mezcla de PCR estándar sin la polimerasa. Esta se calienta a 94° C por 5 minutos, se agregan 2.5 unidades por 50 μ l SuperTaq (HT BIOTECHNOLOGY LTD) y se corre un programa de amplificación estándar en la termocicladora.

PCR StEP

En la primer parte de la PCR StEP se prepara una mezcla de PCR estándar con la salvedad que el molde debe de ser DNA metilado (un plásmido o DNA

metilado *in vitro*). Se prepara por separado un control en el cual no se le agregue los oligonucleótidos. Estas reacción se corren en el programa 94° C x 30 seg.; 55° C x 15-30 seg. De cada mezcla se toman 2 µl y se incuban con 1 µl de la enzima de restricción *Dpn I* (20 unidades) en presencia de 1 µl del amortiguador proveído para la *Supertaq*. Las mezclas se llevan a un volumen final de 10 µl y se incuban a 37° C por 3 o 4 horas. Un microlitro de las digestiones se emplea como molde para una PCR estándar.

Metilación *in vitro*

Aproximadamente 1.5 mg de *ehp(pte)* fueron metilados *in vitro* empleando 20 unidades de la metilasa *Dam I* (2.5 µl de 8000 unidades/ml) en presencia de S-adenosil metionina 8 mM y del amortiguador del proveído para la polimerasa *Supertaq*. El volumen final de la reacción fue de 50 µl. La reacción se incubó a 37° C durante 4 horas.

Barajeo de genes

Empleando como moldes los plásmidos pGEM – *hpter*, pGEM – *ehp*, pGEM – *hpter(pte)* y pGEM – *ehp(pte)* se produjeron, mediante una PCR estándar y con los oligonucleótidos del vector LMB2/LMB3, entre 5 y 7 µg de los genes *hpter*, *ehp*, *hpter(pte)* y *ehp(pte)* respectivamente. Dichos productos se purificaron, y se llevaron a una concentración de 150-175 ng/µl utilizando una DNA SpeedVAC 100 (Sanvant). Para el curso en el tiempo de la digestión con DNAsa I se prepararon cinco alícuotas con 1 µg de DNA (40 ul) en microtubos de 0.5 ml en presencia de MgCl₂ 2.5 mM (4ul de MgCl₂ 20mM) y Tris-HCl 2.5 mM pH 7.4 (4ul Tris-HCl 1M pH 7.4). Las mezclas se incubaron a 15° C en un baño de agua durante 5 minutos. La reacción de digestión se desencadenó con 7 µl de DNAsa I de una concentración de 0.1 mg/µl. Se tomaron alícuotas de 15 µl a los 0, 0.5 , 1,2 y 4 minutos y la reacción detuvo con 5 µl de EDTA 1M, agitando vigorosamente durante 5 min. y

posteriormente incubando durante otros 10 min. a 67° C. Las alícuotas se mezclaron con amortiguador de carga para geles de agarosa y se corrieron en geles de agarosa de alto punto de fusión 3% con bromuro de etidio. Mediante un análisis visual con luz UV, se escogieron dos tiempos de digestión en los cuales al menos el 80% de material estuviera reducido al 10% de tamaño original del gen. Hecho esto, se volvió a digerir material en las mismas condiciones, con la salvedad de que las reacciones se detuvieron en el tiempo escogido. Dicho material se corrió en un gel de agarosa de alto punto de fusión 3% y el material (al menos 80% de este) se extrajo empleando papel de intercambio catiónico (DEAE- celulosa). El papel que contiene el DNA se transfirió a un microtubo de 2 ml y se lavó con 500 µl de NaCl 100mM frío agitándolo durante 5 minutos. El macerado se transfirió a un microtubo de 0.5 ml con un pequeño hoyo en el fondo. Este tubo se colocó dentro de un microtubo de 2 ml y se centrifugó a 4000xg durante 5 minutos en una ultracentrífuga de mesa a temperatura ambiente. Se descartó la solución y el papel seco se transfirió a un microtubo de 2 ml donde se agregaron 500 µl de NaCl 1 M. La mezcla se agitó por 5 minutos y se incubó a 67° C por 10 minutos más. Se repitió el proceso tres veces y cada una de ellas se guardó la fase líquida. El DNA de las tres muestras se extrajo con fenol (este método está descrito en el protocolo de ligación). El DNA extraído se resuspendió en 50 µl de agua destilada.

Para la primera PCR se emplearon la mezcla estándar de amplificación sin oligonucleótidos y usando entre 5-50 µl del DNA fragmentado. El programa de la termocicladora consiste en 96° C x 3 min. y un ciclo de 40 veces 94° C x 30 seg., 55° C x 30 segundos y 72° C x 1 min. + 5 seg. por ciclo. Una vez terminado el programa se tomaron 5 µl de la mezcla de reacción y se corrieron en un gel de agarosa 1%. En estos geles debió aparecer un barrido, en los casos en los que no ocurrió así se modificaron las temperaturas de empalme o la cantidad de DNA fragmentado.

Para la amplificación de los genes ensamblados se corrieron PCR estándares empleando 1 µl de diluciones 1:50, 1:10 y 1:1 de la primera PCR como molde. Se emplearon como oligos anidados los pares Nflag hPTERFor, KpnI (hPTERRev) en el caso de *hpter(pte)* y *hpter*; y Nflag ePHPFor, KpnI (ePHPRev) para *eph(pte)* y *eph*. Se corrieron muestras de estas reacciones en un gel 1%. En los casos en los que se obtuvo un barrido en lugar de una banda clara, se repitió la reacción haciendo diluciones 1:250 y 1:500 de la solución de la primera PCR.

Purificación de los productos de PCR.

El DNA amplificado mediante PCRs fue purificado empleando el kit de Purificación de PCR de Qiagen y siguiendo el protocolo del proveedor.

Digestión

Una vez construidos los genes, las reacciones de PCR fueron extraídas con un kit de Extracción Promega, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se procedió a digerir con las enzimas de restricción *NcoI* y *KpnI*. Las digestiones con enzimas de restricción se llevaron en un amortiguador general de Tris-HCl pH 7.5 100 mM, MgCl₂ 35 mM, KCl 500 mM, BSA 0.5 mg/ml, β-mercaptoetanol 15 mM a 37°C durante 3-4 horas. Las digestiones se purificaron en geles de agarosa – generalmente 1% - empleando el kit de Promega para purificación por gel. En varias ocasiones se tuvo que repetir el proceso de digestión de los fragmentos para tener una ligación y clonación más eficiente.

Ligación

Para la ligación del inserto y vector digeridos se utilizó la DNA ligasa T4. En general, se realizaron en un volumen final de 10 µl conteniendo el amortiguador de ligación, el vector digerido (30-20 ng/ µl), el inserto

digerido (60 ng/ μ l) y DNA ligasa T4. Se realizaron ligaciones a diferentes proporciones de vector e inserto y controles negativos conteniendo vector pero no inserto. Las mezclas e ligaciones se agitaron levemente y la reacción se dejó a 2-3 horas a temperatura ambiente o 16° C por 12-14 horas.

El DNA se extrajo con 2x fenol, 1 x fenol/cloroformo/isoamil alcohol (100:96:4). Se precipitó con 1/10 del volumen con NaAC (3M) y 2.5 x etanol puro por 15 min. a temperatura ambiente. El DNA se lava con 200 μ l de 80% etanol y el botón se resuspendió en 10 μ l de agua pura.

Preparación de células electrocompetentes

En una caja de Petri con medio LB se siembra la cepa de *Escherichia coli* de interés y esta se incuba toda la noche (12-14 hrs.) a 37° C. Se toma una colonia de esta caja y con ella se inoculan 10 ml de medio 2xTY y se inoculan durante 12-14 horas a 30° C o 37° C generalmente con una agitación de 250 rpm. De aquí se toma 1 ml de este cultivo para inocular diez matraces estériles Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio 2xTY. Este cultivo se crece a 37° C y 250 rpm hasta obtener una D.O.₆₀₀ = 0.5-0.75 (fase semilogarítmica de crecimiento). Las células se enfrían en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se las células se cosechan centrifugando a 4000 x g por 20 minutos a 4° C. Los botones se resuspenden en 50 ml de Hepes 1 mM pH 7.0 estéril. Después de incubar en hilo por 15 minutos, la suspensión se vuelve a centrifugar a 4000 x g por 20 minutos a 4° C. Los botones se lavan con 20 ml de glicerol 10% y Hepes 1mM pH 7.0 frío. Se repite una centrifugación a 4000 x g por 20 minutos a 4° C pero ahora los botones se resuspenden en 2-3 ml de glicerol 10% y Hepes 1mM pH 7.0 frío. Se preparan alícuotas de 100ul en criotubos, los cuales se congelan con un baño en nitrógeno líquido y se conservan a -80° C.

Electroporación

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los plásmidos se introdujeron a las células mediante electroporación. Esto se logra aplicando descarga eléctrica de un voltaje alto a una mezcla de células electrocompetentes y plásmidos. La corriente creada permite la entrada del DNA al hacer la membrana celular más permeable (Binotto *et al*, 1991). En general, 2 μ l de la mezcla de ligación se agregan a 40 μ l de células electrocompetentes y esta mezcla se transfiere a una cubeta de electroporación (EQUIBIO) previamente enfriada. Para la electroporación se utiliza el aparato BIORAD Gene PulserTM II con 2.5 kV, resistencia de 200 Ω y 25 μ FD de capacitancia. Una vez recibida la descarga, la mezcla se transfiere a 1ml de medio 2xTY y se incuba a 37° C por 45 - 50 minutos. Posteriormente la mezcla se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos para concentrar las células. El botón se resuspende en 200 μ l del sobrenadante y se esparcen 100 μ l del concentrado y se crean diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 en cajas con medio LB (100ug/ml AMP, 20% Glucosa). Las cajas se incuban a 37° C por 12-14 horas.

Plaqueo de cajas de Petri

Se prepara una solución de medio rico 2xTY mas glucosa 1% y se le ajusta el pH a 7.0 con NaOH. A esta mezcla se le agregan 15 g/litro de bacto-agar y se esteriliza en autoclave. Antes de verter el medio en las placas se le agregan ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml. Las bacterias se sembraban con asas desechables NUNC (Nalge Nunc, International) y las placas se incubaban a 25° C, 30° C o 37° C. Las cajas se almacenaron a 4 °C.

Almacén de las cepas a -80° C

Para el almacenar las cepas se inocularon 5 ml de medio 2xTY con una colonia de interés y se incubaron durante 12 horas a 37° C con agitación de 250 r.p.m. 500 μ l de este cultivo se mezcló con 500 μ l de glicerol estéril

100% en un tubo falcon de criogenia. Se congelaron los tubos inmersiéndolos en nitrógeno líquido para su posterior almacenamiento a -80°C .

Selección *in vivo*

En microplacas de 96 pozos se inocula una clona en 100ml de medio rico 2xTY y 100ml de paraoxón previamente diluido en agua estéril. Se deja creciendo la placa a 37°C con una agitación de 225 r.p.m. Cada hora se mide en un espectrofotómetro de microplacas SpectraMAX 190 (Molecular Devices, California) la D.O. a 600 nm y 405 nm. Modificaciones a este sencillo método son la temperatura a la cual se incuban las bacterias (se probaron 25, 30 y 40 grados), así como hacer preinóculos previos a la selección de tal forma que la D.O.₆₀₀ inicial pudiera ser controlada (se probaron desde D.O.₆₀₀ = 0.01 hasta una D.O.₆₀₀ = 0.5).

Transcripción/Traducción *in vitro*: Selección *in vitro*

En microtubos de 0.2 ml se agregan 25 μl del Sistema *E. coli* S-30 (extracto para moldes lineares), 0.5 μl de la RNA Polimerasa T7 y 2.5 μl de DNA a la concentración requerida (normalmente entre 0.5 nM y 10 nM). Se incuba 20 minutos a 25°C . Se toman alícuotas de 10 μl y se les agregan 150 μl de TRIS 50 mM pH 8.3 y 0.1 mM CoCl_2 , 1 mM NaHCO_3 . Estas mezclas se preparan microplacas de 96 pozos. La reacción se desencadena agregando 40 μl de paraoxón previamente diluido en el mismo amortiguador. Se sigue la reacción a 405 nm en el espectrofotómetro de microplacas SpectraMAX 190.

Secuencia

Los plásmidos o reacciones de PCR purificados con los métodos respectivos se mandaron a secuenciar a la compañía Oswell (South Hampton, R. U.) con los oligonucleótidos necesarios.

Cultivo de bacterias

Se inocularon las clonas de interés en 5ml de medio 2xTY estéril con 100 µg/µl de ampicilina a 37° C con una agitación de 250 r.p.m. durante 12 horas en tubos de polipropileno de 12 ml. De este cultivo se toman 40 µl y se inoculan 4ml de medio 2xTY estéril con 100 µg/µl de ampicilina a 37° C con una agitación de 250 r.p.m. Al alcanzar una D.O.₆₀₀ = 0.5 (aprox. 2 horas) se induce con 1mM de IPTG se transfiere a 30° C (manteniendo la agitación) y se deja creciendo entre 16 y 24 horas.

Electroforesis de gel de poliacrilamida

Para el análisis de sobreexpresión se usaron geles prefabricados de poliacrilamida 20% SDS del sistema electroforético Phast de Pharmacia (Phast system Separation Technique, Pharmacia Biotech, St Albans, UK). Se tomaron alícuotas de cultivo de bacterias inducido y esta se diluyeron _ con al amortiguador Tris/HCl 10 mM, EDTA pH 8.0 1mM, 2.5% SDS 2.5%, 2-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol R-350 0.01%. 1 µl de la mezcla se cargo en el gel junto con los marcadores preteñidos de bajo peso molecular. Para la tinción se empleó azul de Coomassie, lavando posteriormente con una solución de etanol 25% y ácido acético 10%.

Tamizado *in vivo*

Para el ensayo de actividad de paraoxonasa se tomaron del cultivo de bacterias inducido alícuotas y se llevaron a una O.D.₆₀₀ = 0.1. 50 µl de estas diluciones se dispensaron en microplacas de 96 pozos (un pozo por cultivo). Se agregaron 25 µl de CoCl₂ 8 mM en Tris-HCl 50mM pH 8.3 y 25 µl de NaHCO₃ 80 mM en Tris-HCl 50mM pH 8.3. Esta mezcla se agita y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se prepara una solución de paraoxón 0.5 mM en Tris-HCl 50mM pH 8.3. La reacción se desencadena agregando 100 µl de la solución de paraoxón a la mezcla con bacterias. Las

mezcla final contiene CoCl_2 1mM, NaHCO_3 1mM, $\text{D.O.}_{600} = 0.025$ del cultivo de bacterias, paraoxón 0.25 mM y Tris-HCl 40 mM pH 8.3. La hidrólisis de paraoxón se sigue a través de la aparición de *p*-nitrofenol ($\epsilon_{400} = 17,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) a 405 nm y el crecimiento celular a 600 nm (25°C) empleando un espectrofotómetro para microplacas SpectraMAX 190.

Oligonucleótidos

Construcción de *ehp(igps)*

P1for ePHP(IGPS)

5' ACACCATCGGCAAGAACAGCGAATCCGGCATCCGTATTGCGATGCTTCATGCGC 3'

P1rev ePHP(IGPS)

5' ACACCATCGGCAAGAACAGCGAATCCGGCATCCGTATTGCGATGCTTCATGCGC 3'

P2for ePHP(IGPS)

5' GTCATGCTGTGCGATGGATGGTTTTCTGATTGGTTCGGCGTTGATGGCCCCCTCCCATTTAAAAGCC 3'

P2rev ePHP(IGPS)

5' GGCTTTTAAATGGGAGCGGGCCATCAACGCCGAACCAATCAGAAAACCATCCATCGACAGCATGAC 3'

Construcción de *ehp(pte)*

P1afor ePHP(PTE)

5' TACGTGCAGTTCGACCACNNSSSSCACAGTGCNNSSGGTCTAGAAGATAATGCGACCATCGGCAAGAAC 3'

P1arev ePHP(PTE)

5' GTTCTGCGGATGGTTCGATTATCTTCTAGACCSNNGCACTGTGSSSSNNGTGGTCGAACTGCACGTA 3'

P1bfor ePHP(PTE)

5' CTAGAAGATAATGCGAGTGCATCAGCCCTCCTGGGCATCCGTTTCGTGGCAAACACGTATTGCGATGCTT 3'

P1brev ePHP(PTE)

5' CATCGCAATACGTGTTTGCCACGAACGGATGCCAGGAGGGCTGATGCACTCGCATTATCTTCTAG 3'

P2afor ePHP(PTE)

5' GTCATGCTGTGCGATGGACTGGCTGTTCCGGTTTTTCGAGCTATGTCACCAACATCATGCGCTCCCATTTAAAAGCC 3'

P2arev ePHP(PTE)

5' GGCTTTTAAATGGGAGCGCATGATGTTGGTGACATAGCTCGAAAACCGAACAGCCAGTCCATCGACAGCATGAC 3'

Construcción de *hpter(pte)*

P1afor hPTE(PTE)

5' TACTTGGAATATGATCACNNSSSSCACAGTGCNNSSGGTCTAGAAGATAATGCGCTCTTGGTACTGAA 3'

Plarev hPTER(PTE)

5' TTCAGTACCAAAGAGCGCATTATCTTCTAGACCSNNCGCACTGTGSSSSNNGTGATCATATTC CAAGTA 3'

P1bfor hPTER(PTE)

5' CTAGAAGATAATGCGAGTGCATCAGCCCTCTGGGCATCCGTTTCGTGGCAAACAAGAATTAGAAGGGTG 3'

P1brev hPTER(PTE)

5' CACCCCTCTAATCTTGTTTGCCACGAACGGATGCCAGGAGGGCTGATGCACCTCCATTATCTTCTAG 3'

P2afor hPTER(PTE)

5' ATTCTGTAGCACATGACTGGCTGTTCCGGTTTTTCGAGCTATGTCACCAACATCATGAAAACCCGGCTGATGAAA 3'

P2arev hPTER(PTE)

5' TTTCATCAGCCGGGTTTTTCATGATGTTGGTGACATAGCTCGAAAACCCGAACGCCAGTCATGTGCTACCAGAAT 3'

El vector pJB122 (sobreexpresión)

BamH1Flag(ePHPrev)

5' GCCCAGCCGGGATCCTTATTATTATTGGAAAAATTGAGAGGGATTTTCAC 3'

BamH1Flag(OPDrev)

5' GCCCAGCCGGGATCCTTATTATGACGCCCGCAAGGTCGGTGACAAGAACCG 3'

BamH1Flag(hPTERrev)

5' GCCCAGCCGGGATCCTTATTATTTGAAAGTTAGCCATTGCTTAGGGTT 3'

NcoI(ePHPFOR)

5' CATTGCCAAGCCATGGACATGAGTTTTGATCCGACGGGTTACACC 3'

NcoI(OPDfor)

5' CATTGCCAAGCCATGGACATGGCTTCGATCGGCACAGCGATCGGATC 3'

NcoI(hPTERfor)

5' CATTGCCAAGCCATGGACATGTCTTCCTTAAGTGAAAAAGTCCAA 3'

LBRP1-pJB

5' GCGAAGCGGCACTGCTCT 3'

LBRP2-pJB

5' GCTGGTAATGGGTAAAGG 3'

El vector pGEM (transcripción/traducción *in vitro*)

LMB2

5' TGTA AACGACGCCAGT 3'

LMB3

5' CAGGAACAGCTATGAC 3'

LMB2elonged

5' TGTA AACGACGCCAGTGAATTGGATTTAGGTGACACTATAGAATACG 3'

LMB3elonged

5' CAGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACRCTCACTATAGGG 3'

Nflag hPTERFor

5' CATTGCCAAGCCATGGACTACAAAGATGACGATGATAAAATCACCAACAGCATGTCTTCCTTAAGTGGGA 3'

KpnI (hPTERRev)

5' TCGATACGTCGGTACCTTATTATTGAAAGTTAGCCATTGCTTAGGGTT 3'

Nflag OPDFor

5' CATTGCCAAGCCATGGACTACAAAGATGACGATGATAAAATCACCAACAGCGGGGATCGGATCAATACCG 3'

KpnI (OPDRev)

5' TCGATACGTCGGTACCTTATTATGACGCCCGCAAGGTCGGTG 3'

Nflag ePHPFor

5' CATTGCCAAGCCATGGACTACAAAGATGACGATGATAAAATCACCAACAGCATGAGTTTTGATCCGACG 3'

KpnI (ePHPRev)

5' TCGATACGTCGGTACCTTATTATTATTGGAAAAATTGAGAGGGATTTTCAGC 3'

El vector pCE820 (exportación al periplasma)

Opdrev

5' GCCCAGCCGGGATCCATTTGACGCCCGCAAGGTCGGTGACAAGAACCGCGCCGG 3'

pte-sp

5' CGGAGAGAGTAGGCCATGGGCACGAGAAGGGTTGTGCTCAAGTCTGCGGCC 3'

PB78

5' GCTGTTGACAATTAATCATCCGGCTCG 3'

PB79

5' CCGCCAAAACAGCCAAGCTTGCATGCC 3'

Eliminación de la mutación sin sentido *ephp*

ePHP MutSTOPPrev

5' CATCGGCCTGACTGAATCCTG 3'

ePHP MutSTOPfor

5' CAGGATTCAGTCAGGCCGATG 3'

Eliminación del sitio de restricción *NcoI* en *hpter*

NcoIMutFor

5' CTTATGAATGAAATCTDCACGGAGCTGATGGAACCACT 3'

NcoIMutRev

5' ACTGGTCCATCAGCTCCGTGHAGAATTCATTCATAAG 3'

Diversidad para *ephp*

P1aDivFor (ePHP/PTE)

5' TACGTGCAGTTCGACCACNTNNTNCACWMYGCGNTNGGTNTNGANGANWYGCGACCATCGGCAAGAAC 3'

P1aDivRev (ePHP/PTE)

5' GTTCTTGCCGATGGTCGRKWNTCNCNANACCNANCGCRKWGTGNANNANGTGGTCSAACTGCACGTA 3'

P1bDivFor (ePHP/PTE)

5' CTAGAAGATAATGCGWMYGCAWYMGCCNTNNTNGGCNTNARRWMYTGGWYMYCGTATTGCGATGCTT 3'

P1bDivRev (ePHP/PTE)

5' AAGCATCGCAATACGRKWRKWCCKARKWYYTNANGCCNANNANGGCKRWTGCRKWCGCATTATCTTCTAG 3'

P2aDivFor (ePHP/PTE)

5' GTCATGCTGTCGATGGACTGGCTGNTNNNYTTTWMYMYTATNTNWMYMYNTNATGCGCTCCCATTAAAAAGCC 3'

P2aDivRev (ePHP/PTE)

5' GGCTTTTAAATGGGAGCGCATNANRKRKWNANATARKWRKWAARNNNANCAGCCAGTCCATCGACAGCATGAC 3'

P2bDivFor (ePHP/PTE)

5' GTCACCAACATCATGGANNTNATGGANARRNTNWMYNTNGANGGCTATGACTATTTA 3'

P2bDivRev (ePHP/PTE)

5' TAAATAGTCATAGCCNTCNANRKNWNYTNTCCATNANNTCCATGATGTTGGTGAC 3'

Oligos de diversidad para *hpter*

P1aDivRev(hPTER/PTE)

5' TTCAGTACCAAAGAGCGCRKWNTCNTCNANACCNANCGCRKWGTGNANNANGTGATCATATTCCAAGTA 3'

P1aDivFor (hPTER/PTE)

5' TACTTGAATATGATCACNTNNTNCACWMYGCGNTNGGTNTNGANGANWMYGCGCTCTTTGGTACTGAA 3'

P1bDivFor (hPTER/PTE)

5' NTNGANGANWMYGCGWYMGCAWYMGCCNTNNTNGGCNTNARRWMYTGGWYMYAGAATTAGAAGGGTG 3'

P1bDivRev(hPTER/PTE)

5' CACCCTTCTAATTCTRKWRKWCCKARKWYYTNANGCCNANNANGGCKRWTGCRKWCGCRKWNTCNTCNAN 3'

P2aDivFor (hPTER/PTE)

5' ATTCTGGTAGCACATGACTGGCTGNTNNNYTTTWMYMYTATNTNWMYMYNTNATGAAAACCCGGCTGATGAAA 3'

P2aDivRev(hPTER/PTE)

5' TTTCATCAGCCGGTTCATNANRKRKWNANATARKWRKWAARNNNANCAGCCAGTCATGTGCTACCAGAAT 3'

P2bDivFor (hPTER/PTE)

5' GTCACCAACATCATGGANNTNATGGANARRNTNWMYNTNGANGGCTATTCTCATATA 3'

P2bDivRev(hPTER/PTE)

5' TATATGAGAATAGCCNTCNANRKNWNYTNTCCATNANNTCCATGATGTTGGTGAC 3'

TABLA DE ABREVIATURAS

PTE = Fosfotriesterasa de *Pseudomonas diminuta* MG y de *Flavobacterium* sp. (ATCC 27551).

ePHP = Proteína homóloga a la fosfotriesterasa de *Escherichia coli*.

hPTEr = Proteína homóloga a la fosfotriesterasa de humano.

PHP = PHP y hPTEr

IGPS = Indol-2-glicerol-fosfato sintasa.

PRAI = Fosforibosil antranilato isomerasa.

P1 = Asa $\beta 7$ $\alpha 7$ de la PTE.

P2 = Asa $\beta 8$ $\alpha 8$ de la PTE.

ePHP(PTE) = Proteína ePHP híbrida cuyas las asas $\beta 7$ $\alpha 7$ y $\beta 8$ $\alpha 8$ fueron sustituidas por sus homólogas en la PTE (P1 y P2).

hPTEr(PTE) = Proteína hPTEr híbrida cuyas las asas $\beta 7$ $\alpha 7$ y $\beta 8$ $\alpha 8$ fueron sustituidas por sus homólogas en la PTE (P1 y P2).

ePHP(IGPS) = Proteína ePHP híbrida cuyas las asas $\beta 7$ $\alpha 7$ y $\beta 8$ $\alpha 8$ fueron sustituidas por sus homólogas en la IGPS.

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.

StEP = *Staggered Extension Process*.

SDS = Sulfato dodecil de sodio.

IPTG = Isopropil - β -D-tiogalactosido.

REFERENCIAS

- Alimova-Kost M. V., Imreh S., Buchman V. L. y Ninkina N. (1998). Assignment of phosphotriesterase-related gene (PTER) to human chromosome band 10p12 by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, **83**:16-17.
- Altamirano M. M., Blackburn J. M., Aguayo C. y Fersht A. R. (2000a). Directed evolution of a new catalytic activity using the alfa/beta-barrel scaffold. *Nature*, **402**:617-622.
- Altamirano M. M. y Fersht A. R. (2000b). Combinatorial design principles in α/β -barrel proteins for the creation of novel enzymes. En preparación.
- Arnold F. H. (1998a). When blind is better: Protein design by evolution. *Nat Biotech* **16**:617-618.
- Arnold F. H. (1998b). Design by directed evolution. *Accounts Chem Res.* **31**:125-131.
- Arnold F.H. y Volkov A. A. (1999). Directed evolution of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol.* **3**:54-59.
- Arnold, F. H. (2000) Directed Enzyme Evolution; <http://www.che.caltech.edu/group/fha/Enzyme/directed.html>.
- Babbitt P. C. y Gerit J. A. (1997). Understanding enzyme superfamilies: chemistry as the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities. *J Biol Chem*, **272**:30591-30594.
- Bassil I. D., Sarisky C. A. y Mayo S. L. (1997). *De novo* protein design: towards fully automated sequence selection. *J Mol Biol*, **273**:789-796.
- Benning M. M., Kuo J. M., Raushel F. M. y Holden H. M. (1994). Three-dimensional structure of phosphotriesterase: an enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents. *Biochemistry*, **33**:15001-15007.
- Benning M. M., Kuo J. M., Raushel F. M. y Holden H. M. (1995). Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry*, **34**:7973-7978.
- Benning M. M., Hong S.B, Raushel F. M. y Holden H. M. (2000). The binding of substrate analogs to phosphotriesterase. *J Biol Chem*, **275**:30556-30560.
- Berman H. M., Westbrook J. , Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N. y Bourne P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, **28**:235-242 (2000). <http://www.rcsb.org/pdb/>
- Blinotto J. y MacLachlan P. R., Sanderson K. E. 1991. Electrotransformation in *Salmonella typhimurium* LT2. *Can J Microbiol*, **37**:474-447.
- Bornscheuer U. T. (1998). Directed evolution of enzymes. *Agnew Chem Int Ed Engl.* **37**:3105-3108.
- Bränden C. (1991). The TIM barrel- the most frequently occurring folding motif in proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **1**:978-983.
- Bränden C. y Toozee J. (1999). Introduction to Protein Structure. 2nd ed. Garland, New York.
- Buchbinder J. L., Stephenson R. C., Dresser, M.J., Pitera, J. W., Scanlan T. & S. Fletterick, R. J. (1998). Biochemical characterization and crystallographic structure of an *Escherichia coli* protein from the phosphotriesterase gene family. *Biochemistry*, **37**: 5096-106.
- Caldwell S. R., Newcomb J. R., Schlecht K. A., y Raushel F. M. (1991). Limits of Diffusion in the Hydrolysis of Substrates by the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry*, **30**:7438-7444.
- Caldwell R. C. y Joyce G. F. (1992). Randomize of genes by PCR mutagénesis. *PCR Methos Applic*, **2**:28-33.
- Chen-Goodspeed M., Sorgob M. A., Wu F. Y Raushel F. M. (2001). Enhancement, relaxation, and reversal of the stereoselectivity for phosphotriesterase by rational evolution of active site residues. *Biochemistry*, **40**:1332-1339.

- Chotia C. (1992). Proteins. One thousand families for the molecular biologist. *Nature*, **385**:29-30.
- Clackson, C.J. Gussow, D. y Jones, P. T. (1991). General applications of PCR to gene cloning and manipulation (ed. McPherson, Quirke, Taylor), pp. 187-214. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Cole S. T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S. V., Eiglmeier K., Gas S., Barry III C. E., Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver S., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton S., Squares S., Squares R., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S. y Barrell B.G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**:537-544.
- Crameri A, Cwirla S. y Stemmer W. P. (1996). Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nat Med*, **2**:100-102.
- Crameri A., Raillard S. A., Bermudez E. y Stemmer W. P. (1998). DNA shuffling of a family of genes from a diverse species accelerates directed evolution, *Nature*, **391**:288-291.
- Dandekar T., Huynen M., Regula J. T., Ueberle B., Zimmermann C. U., Andrade M. A., Doerks T., Sanchez-Pulido L., Snel B., Suyama M., Yuan Y. P., Herrmann R. y Bork P. (2000) Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames. *Nucleic Acids Res*, **28**:3278-3288.
- Dave K. I., Lauriano C., Xu B., Wild J. R. y Kenerlye (1994) Expression of organophosphate hydrolase in the filamentous fungus *Gliocladium virens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **41**:352-358.
- Darwin, C. (1859). On the Origin of Species by Means of Natural Selection of the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. Murray. London; Reimpreso por Harvard University Press, London, 1994.
- Davies J. A., Buchman V. L. Krylova O. y Ninkina N. N. (1997) Molecular cloning and expression pattern of *rpr-1*, a resiniferatoxin-binding, phosphotriesterase-related protein, expressed in rat kidney tubules. *FEBS Lett*, **410**:378-382.
- Di Sioudi B. D., Miller C. E., Lai K., Grimsley J. K. y Wild, J. R. (1999). Rational design of organophosphorus hydrolase for altered substrate specificities. *Chem Biol Inter*, **119-120**: 211-223.
- Dorit R. L., Schoenbach L. y Gilbert (1990). How big is the universe of exons?. *Science*, **250**:1377-1382.
- Dumas D. P., Caldwell S. R., Wild J. R. y Raushel F. M. (1989). Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J Biol Chem*, **264**:19659-19665.
- Dumas D. P., Durst H. D., Landis W. G., Raushel F. M. y Wild J. R. (1990). Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, *Arch Biochem Biophys*, **277**:155-159.
- Encell L. P., Landis D. M. y Loeb L. A. (1999). Improving enzymes for cancer gene therapy. *Nat Biotechnol*. **17**:143-147.
- Feeler G. y Gerday C. (1997). Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell Mol Life Sci*, **53**:830-841.
- Fersht A. R. (1985a). Measurement and magnitude of enzymatic rate constants. In *Enzyme Structure and Mechanism*. 2nd ed. W.H. Freeman & Co. New York. p 121-154.
- Fersht A. R. (1985b). Enzyme-substrate complementarity and the use of binding energy in catalysis. In *Enzyme Structure and Mechanism*. 2nd Ed. W.H. Freeman & Co. New York. p 311-346
- Freedman B. (1989). *Environmental Ecology: The impact of Pollution and Other Stresses on Ecosystem Structure and Function*. Academic Press. San Diego.

- Gaytán P., Yáñez J., Sánchez F. y Soberón X. (2001). Orthogonal combinatorial mutagenesis: a codon-level combinatorial mutagenesis method useful for low multiplicity and amino acid-scanning protocols. *Nucleic Acid Res*, **29**:3-8.
- Gerlt J. A. y Babbitt P. C. (1998). Mechanistically diverse enzyme superfamilies: the importance of chemistry in the evolution of catalysis. *Curr Opin Chem Biol*, **2**:607-612.
- Giver L. y Arnold, F.H. (1998). Combinatorial protein design by *in vitro* recombination. *Curr Opin Chem Biol*, **2**:335-338.
- Griffiths A. D. y Tawfik D. S. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol*, **16**:652-656.
- Griffiths A. D. y Tawfik D. S. (2000). Man-made enzyme -from design to *in vitro* compartmentalisation. *Curr Opin Biotech*, **11**:338-353.
- Grimsley J. K., Scholtz M. J., Pace N. C. y Wild J. R. (1997). Organophosphorus Hydrolase is a remarkably stable enzyme that unfolds through a homodimeric intermediate. *Biochemistry*, **36**:14366-14374.
- Haber J. E. (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends Biotechnol*, **24**:271-275.
- Harayama S. (1998). Artificial evolution by DNA shuffling. *Trends Biotechnol*, **16**:76-82.
- Harper L. L., McDaniel C. S., Miller C. E. y Wild J. R. (1988) Dissimilar plasmids isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and a *Flavobacterium sp* (ATCC 27551) contain identical *opd* gene. *Appl Environ Microbiol*, **54**:2586-2589.
- Hellinga H. W. (1998). Computational protein engineering. *Nat Struct Biol*, **5**:525-527.
- Hellinga H. W. (1997). Rational protein design: combining theory and experiment. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**:10015-10017.
- Hellmuth K., Korz D. J., Sanders E. A. y Deckwer W.D. 1994. Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. *J. Biotechnol*, **32**:289-298.
- Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., Li B. C. y Herrmann, R. (1996) Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*, **24**:4420-4449.
- Holm L. y Sander C. (1996). *Science* 273,(5275):595-60. En <http://www2.ebi.ac.uk/dali/fsspl/>.
- Holm L. y Sander C. (1997). An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins*, **28**:72-82.
- Hong S. y Raushel F. M. (1996). Metal-Substrate Interactions Facilitate the Catalytic Activity of the Bacterial Phosphotriesterase. *Biochem*, **35**: 10904-10912.
- Hong S. y Raushel F. M. (1999). Stereochemical constraints on the substrate specificity of phosphotriesterase. *Biochemistry*, **38**:1159-1165.
- Hoskin F. C. G., Walker J. E., Dettbarn W. D., y Wild J. R. (1995). Hydrolysis of tetriso by an enzyme derived from *Pseudomonas diminuta* as a model for the detoxification of O-ethyl S-(2-diisopropyl-aminoethyl) methylphosphonothiolate (XV), *Biochem Pharmacol*, **49**:711-715.
- Hou X., Maser R.L., Magenheimer B. S. y Calvet J. P. (1996). A mouse kidney- and liver-expressed cDNA having homology with a prokaryotic parathion hydrolase (phosphotriesterase) gene: abnormal expression in injured and polycystic. *Gene*, **168**:157-163.
- Jablonka E., Lamb M. J. y Avital E. (1998). 'Lamarckian' mechanisms in darwinian evolution. *Trends Ecol Evol*, **13**:206-210.
- Jabri E., Carr M. B., Hausinger R. P. y Karplus P. R. (1995). The crystal structure of urease from *Iebsiella aerogenes*. *Science*, **268**:998-1004.
- Jaenicke R. y Böhm G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struc Biol*, **8**:738-748.
- Jeffery C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci*, **24**:8-11.
- Jooste P. J. y Hugo C. J. (1999). The taxonomy, ecology and cultivation of bacterial genera belonging to the family *Flavobacteriaceae*. *Int J Food Micro*, **53**:81-94.

- Kauffman, S. y Ellington A. D. (1999) Thinking combinatorially. *Curr Opin Struct Biol*, **3**:256-259.
- Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, **217**: 624-626.
- King J. L. y Jukes T. H. (1969). Non-Darwinian evolution: random fixation of selectively neutral mutations. *Science*, **164**:788-798.
- Kirschner K., Szadkowski H., Jaredetzky T. S. y Hager V. (1987). Phosphoribosylanthranilate isomerase-indoleglycerol-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, **142**:386-397.
- Kolakowski J. E., DeFrank J. J., Harvey S. P., Szafraniec L. L., Beaudry W. T., Lai K. y Wild J. R. (1997). Enzymatic hydrolysis of the chemical warfare agent VX and its neurotoxic analogues by organophosphorus hydrolase. *Biocatal Biotransform* **15**:297-312.
- Kuchner O. y Arnold F. H. (1997). Directed evolution of enzyme catalysis. *Trends Biotechnol*, **15**:523-530.
- Kuwata T., Miyazaki Y., Igarashi T., Takehisa J. y Hayami M. (1997). The rapid spread of recombinant during a natural *in vitro* infection with two human immunodeficiency virus type 1 strains. *J virol*, **71**:7088-7091.
- La Du B. N., Aviram M., Billecke S., Navab M., Primo-Pardo S., Sorenson R. C. y Standiford T. J. (1999). On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem-Biol Inter*, **119-120**:379-388.
- Laurence D., Hurst L. D. y Peck J. R. (1996) Recent advances in understating of the evolution and maintenance of sex. *Trends Ecol Evol*, **11**:46-52.
- Lenski R. E., Mittler J. (1993). The directed mutation controversy and neo-Darwinism. *Science*, **259**:188-194.
- Lewis W. E., Donarski W. J., Wild J. R. Raushel F. M. (1988). Mechanism and stereochemical course at phosphorus of the reaction catalyzed by a bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry*. **27**:1591-1597.
- Marrs B., Delagrave S. y Murphy, D. (1999). Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Curr Opin Microbiol*, **2**:241-245.
- Mayr E. (1991). One Long Argument. Charles Darwin and the Genes of Modern Evolutionary Thought. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 206 p.
- McDaniel C. S., Harper L. L. y Wild J. R. (1988). Cloning and sequencing of a plasmid-borne gene (*opd*) encoding a phosphotriesterase. *J Bacteriol*, **170**:2306-2311.
- Minshull J., y Stemmer W. P. (1999) Protein evolution by molecular breeding. *Curr Opin Chem Biol*, **3**:284-290.
- Miroux B. y Walker J. E. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, **3**:289-298.
- Mullis y Falloma.1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*,**155**:335-350.
- Müller H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res*, **1**:2-9.
- Mulbry W. W., Karns J. S., Kearney P. C., Nelson J. O., McDaniel C. S. y Wild J. R. (1986). Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium sp* by Southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta*. *Appl Environ Microbiol*, **51**: 926-930.
- Mulbry W. W. (2000). Characterisation of a novel organophosphorus hydrolase from *Nocardiodes simplex* NRRL B-24074. *Microbiol Res*, **154**:285-288.
- Mulbry W. W. y Karns J. S. (1989). Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene: relationship between the gene and the protein. *J Bacteriol*, **171**:6740-6746.
- Munnecke D. M. y Hsieh D. P. (1974). Microbial decontamination of parathion and *p*-nitrophenol in aqueous media. *Microbiol*, **2**:212-217.

- Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol*, **247**:536-540.
- O'Brian P. J. y Herschlag D. (1999). Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem Biol*, **6**:R91-R105.
- Ohta T. (2000). Mechanisms of molecular evolution. *Phil Trans R Soc Lond*, **355**: 1623-1626.
- Omburo G. A., Kuo J. M., Mullins L. S. y Raushel F. M. (1992) Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. *J Biol Chem*, **267**:13278-13283.
- Organización Panamericana de la Salud OMS, División de Salud y Ambiente. Washington, DC (1993). *Plaguicidas y Salud en las Américas*, Serie Ambiental No. 12.
- Orengo C. A., Jones D. T. y Thornton, J. M. (1994). Proteins superfamilies and domain superfold. *Nature*, **372**:631-634.
- Que S., Okamoto A., Yano T. y Kagamiyama H. (1998). Redesigning the substrate specificity of an enzyme by cumulative effects of the mutations of non-active site residues. *J Biol Chem*, **274**: 2344-2349.
- Patten P. A, Howard, R. J. y Stemmer W. P. (1997). Applications of DNA shuffling to pharmaceutical and vaccines. *Curr Opin Biotechnol*, **8**: 724-733.
- Peitsch M. C. (1996) . Promod and swiss-model: internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans*, **24**:274-
- Peitsch M. C y,Guex N. (1997a). Large-scale comparative protein modelling. Proteome research: new frontiers in functional. *Genomics*,177
- Peitsch M. C y,Guex N. (1997b) Swiss-model and the swiss-pdbviewer: an Environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, **18**: 2714-
- Petsko G. A., Kenyon G. L., Gerlt J. A., Ringe D. y Kozarch J. W. (1993). On the origin of enzymatic species. *Trends Biochem Sci*, **18**:372-376.
- Philipp W. J., Poulet S., Eighneier K., Pascopella L., Balasubramanian V., Heym B., Bergh S., Bloom B. R., Jacobs W. R. y Cole S. T. (1996). An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**:3132-3137.
- Phillip J. P., Xin J. H., Kirby K., Milne J. C. P., Krell P. y Wild J. R. (1990). Transfer and expression of an organophosphate insecticide-degrading gene from *Pseudomonas* in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**:8155-8159.
- Reidhaar-Olson J., Bowie J., Breyer R. M., Hu J. C., Knight K. L., Lim W.A., Mossing M. C., Parsell D. A. , Shoemaker D. R. y Sauer R. T. (1992). Random mutagenesis of protein sequences using oligonucleotide cassettes. *Methos Enzymol*, **208**:564-586.
- Reynaud C. A., Bertocci B., Frey S., Delbos F., Quint L. y Weill J.C. (1999). Mismatch repair and immunoglobulin gene hypermutation: did we learn something?. *Immun Today*, **22**:522-527.
- Ridley M. (1996). Evolution, 2nd ed. Blackwell Science Inc. Cambridge Massachusetts. pp. 316-334.
- Sadowsky M. J., Tong Z., de Souza M. y Wackett L. P. (1998). AztC is a new member of the amidohydrolyase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. *J Bacteriol*, **180**:152-158.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. y Erlich H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**:487-491.
- Scanlan T. S. y Reid R. C. (1995). Evolution in action. *Chem Biol*, **2**:71-75.
- Schrader G. (1950). *Angew. Chem.* **62**: 71-473.
- Shafferman A., Ordentlich A., Barak D., Stein D., Ariel N, y Velan B, (1996). Aging of phosphorylated human acetylcholinesterase: catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre . *Biochem J*, **318**:833-840.

- Shao Z. y Arnold F. H. (1996) Engineering new functions and altering existing functions. *Curr Opin Struct Biol*, **6**:513-518.
- Spiers A. J., Buckling A. y Rainey P. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol*, **146**:2345-2350.
- Steipe B. (1999) Evolutionary approaches to protein engineering. *Curr Top Microbiol Immunol*, **243**:55-86.
- Stemmer W. P. (1994a). Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature*, **370**:389-391.
- Stemmer W. P. (1994b). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**:10747-10751.
- Stemmer W. P. y Soong N. W. (1999). Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties. *Tumour Target*, **4**:59-62.
- Tonegawa S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**:572-581.
- Tobin M. B., Gustafsson C. y Huisman G. W. (2000). Directed evolution: the "rational" basis for "irrational" design. *Curr Opin Struct Biol*, **10**:421-427.
- Todd A. E., Orengo C. A. y Thornton J. M. (1999). Evolution of protein function, from a structural perspective. *Curr Opin Chem Biol*, **3**:548-556.
- Vanhooke J. L., Benning M. M., Raushel F. M. & Holden H. M. (1996). Three-dimensional structure of the zinc-containing phosphotriesterase with the bound substrate analogue diethyl 4-methylbenzylphosphonate. *Biochem*, **35**:6020-6025.
- de la Vega-Salazar M., Martínez-Tabche L., Macías-García C. y Díaz-Pardo E. (1997a). Methyl parathion impact on water, sediments and benthic macroinvertebrates from the Ignacio Ramirez Dam, México. *Tox Environ Chem*, **71**:81-93.
- de la Vega-Salazar M., Martínez-Tabche L. y Macías-García C. (1997b). Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramirez Dam in Mexico.
- Wilson D. K. y Quiocho F. A. (1993). A pre-transition-state mimic of an enzyme: x-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water. *Biochem*, **43**:1689-1694.
- White O., Eisen J. A., Heidelberg J. F., Hickey E. K., Peterson J. D., Dodson R. J., Haft D. H., Gwinn M. L., Nelson W. C., Richardson D. L., Moffat K. S., Qin H., Jiang L., Pamphile W., Crosby M., Shen M., Vamathevan J. J., Lam P., McDonald L., Utterback T., Zalewski C., Makarova K. S., Aravind L., Daly M. J., Fraser C. M. *et al.* (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**:1571-1577.
- West S. A., Lively C. M. y Read A. F. (1999). A pluralist approach to sex and recombination. *J Evol Biol*, **12**:1003-1012.
- Wolf Y. I., Brenner S. E., Bash P. A. y Koonin E. V. (1999). Distribution of protein folds in the three superkingdoms of life. *Genome Res*, **9**:17-26.
- Zhan C.G., Souza O.N. d., Rittenhaouse R. C. y Ornstein R. L. (1999). Determination of two structural forms of catalytic bridging ligand in Zinc-phosphotriesterase by molecular dynamics simulation and quantum chemical calculation. *J Am Chem Soc*, **121**:7279-7282.
- Zhao H., Giver L., Shao Z., Affholter J. A., Arnold F. H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat Biotechnol*, **16**:258-261.