



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

MUTAGÉNESIS POR CODÓN EN EL
PÉPTIDO SEÑAL DE PENICILINA G
ACILASA DE *Escherichia coli*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

OLGA LIDIA MONROY LAGOS



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Tutor:

Dr. JOEL OSUNA QUINTERO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno
Monroy
Lagos
Olga Lidia
56 66 81 71
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Facultad de Ciencias
Biología
096299830
2. Datos del tutor
Dr
Joel
Osuna
Quintero
3. Datos del sinodal 1
Dr
Humberto
Flores
Soto
4. Datos del sinodal 2
Quim
Viviana
Escobar
Sanchez
5. Datos del sinodal 3
M en C
Alfonso Jose
Vilchis
Peluyera
6. Datos del sinodal 4
Dr
Victor Manuel
Valdes
Lopez
7. Datos del trabajo escrito
Mutagenesis por codon en el peptido señal de Penicilina G acilasa de
Escherichia coli.
99 p
2007

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Mutagénesis por codón en el péptido señal de Penicilina G
acilasa de Escherichia coli"

realizado por Olga Lidia Monroy Lagos

con número de cuenta 09629983-0 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)
Propietario Dr. Joel Osuna Quintero

Propietario Dr. Humberto Flores Soto

Propietario Quim. Viviana Escobar Sánchez

Suplente M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera

Suplente Dr. Víctor Manuel Valdes López

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 22 de noviembre del 2006
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA

Dr. Zenón Cano Santana



Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de UNAM/DGAPA bajo la concesión IN214803 y por CONACYT/SEP con la concesión 43502-Q.

Y por parte del Instituto de Biotecnología, UNAM. Así como por la beca para alumnos de investigadores SNI III.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Joel Osuna Quintero, Investigador Titular "A", en el laboratorio del Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero, departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en Cuernavaca, Morelos.

Agradecimientos

A mi Madre, la mujer más fuerte, capaz e increíble que he conocido, la mujer que me ha brindado todo su amor, su conocimiento, sus valores... en fin TODO. Gracias!!!

A Anuar por haber llegado a mi vida y llenarla de alegría, por amarme y sobre todo ayudarme a confiar en mi.

A mi familia: Elisa, Juan, Montserrat, Anahí, Teresa, Mayte, Raul, Gabriela, Alejandra, Brian, Jesús y Joseline.

A Lizbeth, Rafael y Lucio, con los que compartido tantas experiencias que nos han unido a punto tal de ser los mejores amigos. A los cuates de la facultad Tonatiuh, Alejandro Frías, Alejandro Vela, Marlen, Araceli, Tania, Aime, Sandra y muchos más que nunca terminaría.

A Alfredo Ayala, Víctor Valdés y Sonia Dávila, por sembrar en mí la semillita de la biología molecular. La cual creció con cada uno de los Doctores del taller "Biología Molecular Nuevos Enfoques y Paradigmas".

A mis compañeros de Taller, principalmente a Alma Tovar con quien conviví durante la mayor parte de mi estancia en Cuernavaca. A todas las amistades que hice en el IBt.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Dr. Enrique Morett, Dr. Alejandro García Rubio, Dra. Gloria Saab, Dra. Gabriela Montero, Dra. Martha Argüello, Dr. Humberto Flores, Dr. Ricardo Cano, Alfredo, Gabriel, Ángel, Maricela, Leticia, Yagul, Esmeralda, Chistian, Etienne, Filiberto, Adrián, Polo Maricruz, Biviana, Juana, Gabriela Flores, Luis Ledesma, Santiago, Juan Carlos, Luis Lozano, Sra. Juana Ferre, Sr. Francisco Reyes y no podía faltar la buena Nelly.

A Paul Gaytán y Eugenio López, por el apoyo en la síntesis de oligos. Y a Jorge Yáñez en la secuenciación de ADN.

Quiero agradecer al Dr. Xavier Soberón, por haberme aceptado en su grupo. Y especialmente al Dr. Joel Osuna Quintero por permitirme trabajar con él, por su interés, dedicación y sobretodo paciencia para transmitirme un poco de su conocimiento para realizar esta tesis. Y por mostrarme al ser humano detrás del investigador.

A Mis sinodales Alfonso, Humberto, Viviana y Víctor, por haberme brindado su tiempo, dedicación y conocimiento para la realización de esta tesis.

Índice General

Índice.....	vi
I Resumen.....	1
II Introducción.....	2
II.1 Las Penicilina acilasas.....	2
II.1.1 Penicilina G acilasa de <i>Escherichia coli</i>	4
II.1.2 Procesamiento de PGA.....	5
II.1.3 Mecanismo de acción.....	9
II.1.4 Regulación y pasos limitantes en la producción de PGA.....	12
II.1.5 Estrategias para aumentar la producción de PGA.....	14
II.2 Sistema de translocación Tat.....	17
II.2.1 El péptido señal.....	18
II.2.2 Componentes de Tat.....	19
II.2.3 Funciones de los componentes de Tat.....	21
II.2.4 Eliminación del sistema Tat.....	22
II.3 Diferencias entre los sistemas de translocación Tat y Sec.....	24
II.4 Relación de PGA con los antibióticos β -lactámicos.....	26
II.4.1 Antibióticos β -lactámicos semisintéticos.....	26
III Antecedentes.....	29
III.1 Selección de PGA por el sistema Tat.....	29
III.2 Nuevos sistemas de mutagénesis a nivel de codón.....	31
III.3 Sistema de selección para actividad de PGA.....	33
IV Objetivos.....	35
IV.1 Objetivo general.....	35
IV.2 Objetivos particulares.....	35
V Materiales y métodos.....	36
V.1 Medios de cultivo y soluciones.....	36
V.2 Procedimientos generales.....	38
V.2.1 Purificación de plásmidos.....	38
V.2.2 Purificación de productos de PCR.....	39
V.2.3 Extracciones por electroforesis en gel de azarosa.....	39
V.2.4 Preparación de células electrocompetentes.....	40
V.2.5 Electrotransformación.....	40
V.2.6 Secuenciación.....	41
V.2.7 Digestiones.....	41

V.2.8 Limpieza de digestiones.....	41
V.2.9 Ligaciones.....	42
V.3 Los oligonucleótidos.....	42
V.4 Las enzimas.....	43
V.5 Las cepas.....	46
V.6 Preparación del vector.....	47
V.6.1 Cambio de <i>NcoI</i> por <i>NdeI</i>	47
V.6.2 Reemplazamiento de β -lactamasa por <i>pac</i>	49
V.6.3 Corrección de <i>pac</i>	50
V.6.4 Cambio de vector.....	51
V.6.5 Introducción del sitio de restricción <i>SacI</i>	52
V.7 Lamutagénesis al azar.....	53
V.7.1 La reacciones de polimerización con el fragmento Klenow....	54
V.8 La clonación.....	56
V.8.1 Las digestiones.....	56
V.8.2 Las ligaciones.....	56
V.9 Selección de colonias mutantes.....	58
V.9.1 Variantes aisladas al azar o sin selección.....	58
V.9.2 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC_{penG}).....	58
V.9.3 Selección directa a penicilina G.....	59
V.10 Actividad enzimática.....	60
V.10.1 Determinación de la concentración de proteína.....	60
V.10.2 Método de paradimetilaminobenzaldehído (PDAB) para la determinación de 6-APA.....	61
V.11 Colocación del <i>TAG</i>	61
V.12 Inmunodetección de Penicilina G acilasa.....	62
V.12.1 Gel SDS-PAGE.....	62
V.12.2 La inmunodetección.....	63
V.13 Re-clonación.....	63
V.14 Análisis de la diversidad de las librerías, clonación en el vector pT4BLA/ <i>Sac</i> ⁺	64
V.14.1 El vector: pT4BLA/ <i>Sac</i> ⁺	64
V.14.2 La librería NH.....	64
V.14.3 La librería COOH.....	65
V.15 Método Tat P.....	65
I Resultados.....	66
VI.1 El vector pT4PAC/ <i>Sac</i> ⁺	66
VI.2 La mutagénesis al azar.....	66
VI.3 Variantes aisladas al azar o sin selección.....	66
VI.4 Variantes aisladas con actividad de PGA.....	66
VI.5 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para penicilina G...67	
VI.6 Péptidos señal no funcionales.....	68
VI.7 Péptidos señal funcionales.....	69

VI.8 Re-clonación.....	72
VI.9 Niveles de actividad enzimática.....	74
VI.10 Niveles de expresión de penicilina G.....	74
VI.11 Diversidad de la librería.....	76
VI.12 Método Tat P.....	77
VII Discusión de resultados.....	78
VII.1 Diversidad de la librería.....	78
VII.2 Variantes aisladas al azar.....	78
VII.3 Variantes no funcionales.....	79
VII.4 Variantes funcionales.....	82
VII.5 Expresión y niveles de actividad de PAC.....	84
VII.6 El sitio Shine Dalgarno.....	85
VII.7 Método Tat P.....	85
VIII Conclusiones.....	86
IX Perspectivas.....	87
X Apéndice.....	88
XI Bibliografía.....	93

I Resumen

La Penicilina G acilasa (PGA), es una enzima de interés industrial, ya que lleva a cabo la hidrólisis de Penicilina G para dar como productos ácido fenilacético (PAA) y ácido 6 aminopenicilánico (6 APA), este último es el componente principal para la síntesis de antibióticos semisintéticos.

La PGA es sintetizada como un precursor polipeptídico citoplasmático (PrePro PGA), el cual es transportado hacia el periplasma de la bacteria mediante el sistema de transporte **Tat**. La proteína pierde el péptido señal, para formar un segundo precursor (Pro PGA). Este segundo precursor sigue el proceso de maduración de la enzima, el cual es la remoción del péptido conector y la unión de las subunidades, para dar lugar finalmente a la proteína madura.

En el presente trabajo, mutagenizamos al azar el péptido señal de PGA en busca de variantes que presenten una diferencia en la eficiencia de translocación de la enzima hacia el periplasma. Se clonó el gen *pac* de *Escherichia coli* AECC11105, en un vector que contiene el promotor débil de β -lactamasa, pT4BLA. Utilizando la técnica de mutagénesis por codón (Gaytan, 2004), se mutó al azar el péptido señal en dos regiones, una corresponde a las posiciones 2-13 y la otra a las posiciones 14-25 (NH y COOH), obteniendo así dos bancos de mutantes. Estos bancos fueron introducidos a una cepa XL1Blue que contiene el vector pACYCPKGS-9, que le confiere resistencia a 6 APA.

Siguiendo la estrategia de selección desarrollada por Flores y colaboradores para la búsqueda de mutantes con actividad de PGA, la cual esta basada en los la resistencia a penicilina G, encontramos mutantes con diferentes niveles de resistencia a penicilina G tanto por arriba (péptidos señal activos) como por debajo (péptidos señal deficientes) de los niveles de resistencia de la silvestre. Por medio de la prueba diseñada por Balasingham para PGA determinamos la actividad de PGA para las mutantes y corroboramos la cantidad de enzima por medio de inmunodetección por western blot. Por medio de estas pruebas logramos determinar que algunas de nuestras mutantes tienen hasta 3 o 4 veces mayor actividad que la enzima silvestre, lo cual concuerda con la cantidad de enzima en periplasma observada por "western blot".

II Introducción

II.1 Las Penicilina acilasas

Las Penicilina acilasas (PA) son un grupo de enzimas involucradas en la producción industrial del 6-ácido aminopenicilánico (6 APA), que es el componente inicial o núcleo para la síntesis de antibióticos β -lactámicos semisintéticos (1,3).

PA también pueden ser utilizadas en otras biotransformaciones, tales como:

- ◆ Síntesis de péptidos.
- ◆ La resolución de mezclas racémicas de compuestos quirales.
- ◆ En la detección de nuevas especificidades enzimáticas hacia otras penicilinas naturales.
- ◆ Inmovilización enzimática
- ◆ Optimización de enzimas que catalizan la hidrólisis y síntesis en presencia de solventes orgánicos (1,2).

Las Penicilina acilasas se encuentran presentes en una gran variedad de organismos, tales como: bacterias gram negativas, bacterias gram positivas, hongos y levaduras (1,3,7). El papel que juegan las penicilina acilasas *in vivo* aún no ha sido elucidado, sin embargo se ha propuesto que estas enzimas pueden funcionar durante el modo de vida libre para metabolizar compuestos aromáticos y generar una fuente de carbono (2). Esto se ha pensado porque degradan componentes fenilacétilados, generando ácido fenilacético (PAA) el cual puede ser utilizado como fuente de carbono (2).

Dependiendo de su origen las Penicilina acilasas difieren en sus propiedades y se clasifican de acuerdo con la especificidad de su sustrato (Fig.1) (1-3).

Penicilina acilasas:

- **Tipo I** (fúngicas)

La característica primordial de las penicilina acilasas tipo I, es que hidrolizan fenoximetilpenicilina (penicilina V) más rápido que benzilpenicilina (penicilina G). Ha sido descrita en varias especies de actinomicetes, hongos filamentosos y levaduras (1,3).

- **Tipo II** (bacterianas)

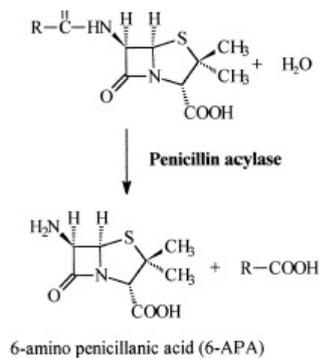
Las penicilina acilasas tipo II hidrolizan mucho más rápido benzilpenicilina (penicilina G) que fenoximetilpenicilina (penicilina V). Este tipo de actividad ha sido encontrado en los géneros:

Aerobacter, Alcaligenes, Bordetella, Cellulomonas, Corynebacterium, Erwinia, Escherichia, Flavobacterium, Micrococcus, Nocardia, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Sarcina y Xhantomonas (3).

- **Tipo III**

Este tipo de penicilina acilasas son las que utilizan como sustrato a la ampicilina (2).

a)



b)

Antibiotic	R
Penicillin G	
Penicillin V	
Ampicillin	

Figura 1. a) Las penicilina acilasas catalizan la hidrólisis de las penicilinas para producir ácido 6-aminopenicilánico. b) Con base en la especificidad por su sustrato se pueden clasificar en tres grupos: penicilina G acilasas, penicilina V acilasas y ampicilina acilasas (Arroyo et al. 2003).

II.1.1 Penicilina G acilasa de *Escherichia coli*

A pesar de que PA es producida por una amplia variedad de organismos, *E. coli* es el organismo más utilizado para la producción de dicha enzima (11).

La penicilina G acilasa de *E. coli* ATCC11105 (E.C.3.5.1.11), pertenece a la superfamilia de enzimas: nucleófilo, hidrolasa amino terminal (Ntn-hidrolasas) (1,6,7). Generalmente es sintetizada como una proteína precursora, que sufre un procesamiento autocatalítico post-traducciona, para generar la proteína madura con el centro catalítico en el nuevo amino terminal (5,6,10).

En el caso específico de PGA de *E. coli*, el nucleófilo amino terminal es un residuo de serina (Ser_{1:B}) de la cadena β (6,7,9). La superfamilia de enzimas no solo muestra un procesamiento similar, sino también una estructura cuaternaria equivalente. El plegamiento característico de las Ntn- hidrolasas consiste de un núcleo $\alpha\beta\alpha$ con cuatro capas que forman el sitio activo, conformado por dos cadenas β empaquetadas una contra otra y cubiertas por una capa de α hélices antiparalelas en un lado (Fig. 2)(1,6,7).

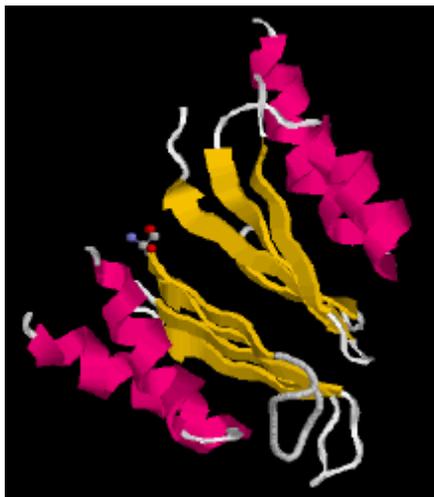


Figura 2. Estructura del plegamiento característico de las Ntn-hidrolasas, el cual consiste de 4 laminas con un centro $\alpha\beta\alpha$ que forma el sitio activo.

La enzima catalíticamente activa es un heterodímero localizado en el espacio periplasmático (Fig. 3). El heterodímero tiene un peso molecular de 86 KDa y está compuesto por la subunidad α de 23 KDa y la subunidad β de 62.24 KDa. Las subunidades están unidas por fuerzas débiles no covalentes (6,7).

II.1.2 Procesamiento de PGA

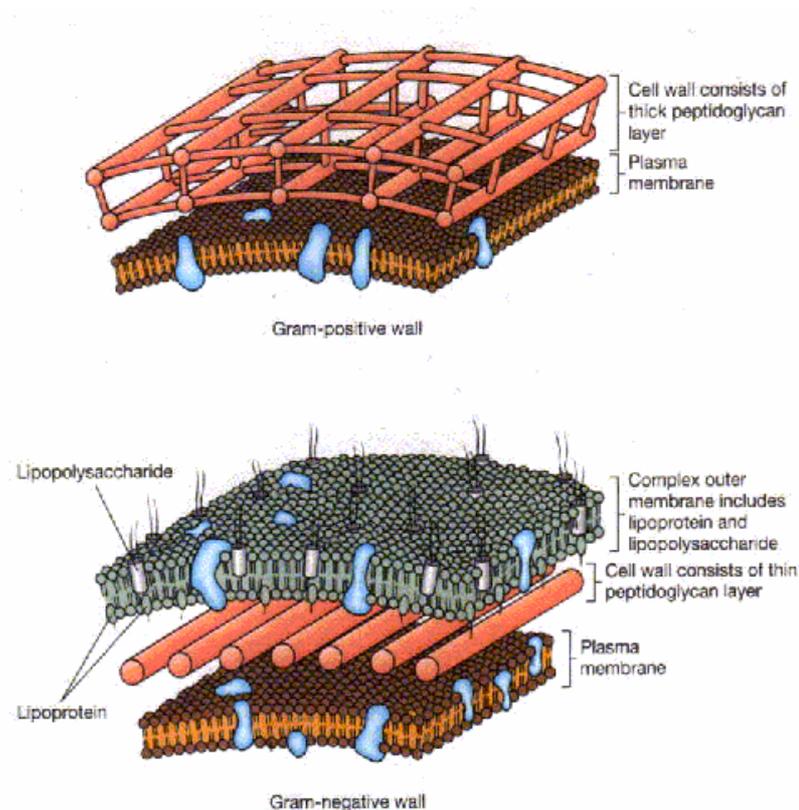


Figura 3. Diagrama que muestra las diferencias en la cubierta celular de las bacterias Gram positivas (arriba) y Gram negativas (abajo).

Las bacterias Gram positivas consisten de pared celular y membrana plasmática.

Las Gram negativas por: una membrana externa, una pared celular, un espacio periplasmático y la membrana periplasmática.

Este orden está dado del exterior hacia el interior.

PGA es sintetizada como un precursor (PrePro PGA) el cual es codificado por el gen *pac*, cuyo marco de lectura abierto codifica para los cuatro dominios estructurales (5):

- i) posiciones 1-78 codifican para el péptido señal.
- ii) posiciones 79-705 codifican para la subunidad α .
- iii) Posiciones 706-867 codifican para el péptido conector.
- iv) Posiciones 868- 2538 codifican para la subunidad β (Figs. 4 y 5).

1
-52

SD

Met Lys Asn Arg Asn Arg Met Ile Val Asn Cys Val Thr
ATG AAA AAT AGA AAT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT

AAGCTTCGGTTCAGTAGTATCAATTGCGTAATTATACACCTGCCAGAGGATACA
HindIII Gc →

14 Ala Ser Leu Met Tyr Tyr Trp Ser Leu Pro Ala Leu Ala Glu Gln Ser Ser Ser Glu Ile Lys Ile Val Arg Asp Glu Tyr
40 GCT TCC CTG ATG TAT TAT TGG AGC TTA CCT GCA CTG GCT GAG CAG TCG TCA AGT GAG ATA AAG ATT GTT CGC GAT GAA TAC

41 Gly Met Pro His Ile Tyr Ala Asn Asp Thr Trp His Leu Phe Tyr Gly Tyr Gly Tyr Val Val Ala Gln Asp Arg Leu Phe
121 GGC ATG CCG CAT ATT TAT TAT GCC AAT GAT ACA TGG CAC CTA TTT TAT GGC TAT GGC TAT GGC TAT GTA GTA GCA CAA GAT CGC CTT TTT

68 Gln Met Glu Met Ala Arg Arg Ser Thr Gln Gly Thr Val Ala Glu Val Leu Gly Lys Asp Phe Val Lys Phe Asp Lys Asp
202 CAG ATG GAA ATG GCA CGT CGC AGT ACT CAA GGG ACT GTC GCG GAA GTG CTT GGC AAA GAT TTT GTG AAA TTT GAT AAA GAT

95 Ile Arg Arg Asn Tyr Trp Pro Asp Ala Ile Arg Ala Gln Ile Ala Ala Leu Ser Pro Glu Asp Met Ser Ile Leu Gln Gly
283 ATC CGT CGT AAC TAC TGG CCG GAT TCA ATC CGC GCG CAA ATT GCT GCC CTT TCC CCA GAG GAT ATG TCC ATT CTG CAA GGC

122 Tyr Ala Asp Gly Met Asn Ala Trp Ile Asp Lys Val Asn Thr Asn Pro Glu Thr Leu Leu Pro Lys Gln Phe Asn Thr Phe
364 TAC GCT GAT GGA ATG AAT GCC TGG ATT GAT AAG GTA AAT ACC AAT CCA GAG ACG CTC TTA CCA AAA CAG TTT AAT ACA TTT

149 Gly Phe Thr Pro Lys Arg Trp Glu Pro Phe Asp Val Ala Met Ile Phe Val Gly Thr Met Ala Asn Arg Phe Ser Asp Ser
445 GCG TTT ACT CTT AAG CGC TGG GAA CCG TTT GAT GCG GCA ATT GCT GCC CTT TCC CCA GAG GAT ATG TCC ATT CTG CAA GGC

176 Thr Ser Glu Ile Asp Asn Leu Ala Leu Leu Thr Ala Leu Lys Asp Lys Tyr Gly Val Ser Gln Gly Met Ala Val Phe Asn
526 ACT AGC GAA ATT GAT AAT CTG GCA CTG CTA ACG GCT TTA AAA GAT AAA TAT GGT GTA TCA CAA GGC ATG CCG GTA TTT AAT

203 Gln Leu Lys Trp Leu Val Asn Pro Ser Ala Pro Thr Thr Ile Ala Val Gln Glu Ser Asn Tyr Pro Leu Lys Phe Asn Gln
607 CAG TTG AAA TGG CTG GTA AAC CCA CCA GCG CCA ACT ACT TTA GCA CAA GAG AGT AAC TAC CCA CTT AAA TTT GAT AAA GGC

230 Gln Asn Ser Gln Thr Ala Ala Leu Leu Pro Arg Tyr Asp Leu Pro Ala Pro Met Leu Asp Arg Pro Ala Lys Gly Ala Asp
688 CAA AAC TCG CAA ACA GGA GCT CTG TTG CCA CCG TAC GAT TTA CCT GCA CCA ATG CTT GAC CGA CCA GCA AAA GGG GCG GAT

257 Gly Ala Leu Leu Ala Leu Thr Ala Gly Lys Asn Arg Glu Thr Ile Val Ala Gln Phe Ala Gln Gly Gly Ala Asn Gly Leu
769 GGC GCA CTG CCG TTA ACA GCA GGG AAG AAC CCG GAA ACT ATT GTT GCA CAA TTT GCA CAG GGT GCT GCG AAT GGT CTG

284 Ala Gly Tyr Pro Thr Thr Ser Asn Met Trp Val Ile Gly Lys Ser Lys Ala Gln Asp Ala Lys Ala Ile Met Val Asn Gly
850 GCG GGG TAT CCA ACG ACC AGC AAT ATG TGG GTT ATC GGC AAA AGC AAA GCC CAG GAT GCG AAA GCA ATC ATG GTA AAT GCT

311 Pro Gln Phe Gly Trp Tyr Ala Pro Ala Tyr Thr Thr Tyr Gly Ile Gly Leu His Gly Ala Gly Tyr Asp Val Thr Gly Asn Thr
931 CCG CAG TTT GCG TAT GCG CCT GGT TAT ACT TAT GGT ATT GGT TAT GGT TAT

338 Pro Phe Ala Tyr Pro Gly Leu Val Phe Gly His Asn Gly Val Ile Ser Trp Gly Ser Thr Ala Gly Phe Gly Asp Asp Val
1012 CCA TTT GCC TAT CCT GGG CTG GTT TTT GGT CAT AAT GGT GTG ATT TCC TGG GGA TCA ACG GCA GGT TTC GGC GAT GAT GAT GAT

365 Asp Ile Phe Ala Glu Arg Leu Ser Ala Glu Lys Pro GCG Tyr Tyr Leu His Asn Gly Lys Trp Val Lys Met Leu Ser Arg
1093 GAT ATT TTT GCT GAA CCG CTG TCG GCA GAG AAA CCA GCG TAC TAC

392 Glu Glu Thr Ile Thr Val Lys Asn Gly Gln Ala Glu Thr Phe Thr Val Trp Arg Thr Val His Gly Asn Ile Leu Gln Thr
1174 GAG GAA ACC ATT ACG GTG AAA AAT GGT CAG GCA GAG ACC TTT ACT GTC TGG CGT ACG GTG CAT GGC AAC ATT CTC CAA ACT

419 Asp Gln Thr Thr Gln Thr Ala Tyr Ala Lys Ser Arg Ala Trp Asp Gly Lys Glu Val Ala Ser Leu Leu Ala Trp Thr His
1255 GAC CAG ACG ACA CAA ACG GCT TAC GCT AAA TCC CCG GCA TGG GAT GGT AAA GAG GTG CCG TCT TTG CTC GCC TGG ACT CAT

446 Gln Met Lys Ala Lys Asn Trp Gln Glu Trp Thr Gln Gln Ala Ala Lys Gln Ala Leu Thr Ile Asn Trp Tyr Tyr Ala Asp
1336 CAG ATG AAG GCC AAA AAT TGG CAG GAG TGG ACA CAG CAG GCA GCG AAA CAA GCA CTG ACC ATC AAC TGG TAC TAT GCT GAT

473 Val Asn Gly Asn Ile Gly Tyr Val His Thr Gly Ala Tyr Pro Asp Arg Gln Ser Gly His Asp Pro Arg Leu Pro Val Pro
1417 GTA AAC GGC AAT ATT GGT TAT GTT CAT ACT GGT TAT CCA GAT CTT TCA GGT CCA GAT CCG CGT CCA TCA CCC GTT CCT

500 Gly Thr Gly Lys Trp Asp Trp Lys Gly Leu Leu Pro Phe Glu Met Asn Pro Lys Val Tyr Asn Pro Gln Ser Gly Tyr Ile
1498 GGT ACG GGA AAA TGG GAC TGG AAA GGG CTA TTG CCT TTT GAA ATG AAC CCT AAG GTG TAT AAC CCC CAG TCG GGA TAT ATT

527 Ala Asn Trp Asn Asn Ser Pro Gln Lys Asp Tyr Pro Ala Ser Asp Leu Phe Ala Phe Leu Trp Gly Gly Ala Asp Arg Val
1579 GCT AAC TGG AAC TCT CCC CCA AAA GAT TAT CCC GCT TCA GAT TTT GCC TTT TTG TGG GGT GGT GCA GAT CCG GCT

554 Thr Glu Ile Asp Arg Leu Leu Glu Gln Lys Pro Arg Leu Thr Ala Asp Gln Ala Trp Asp Val Ile Arg Gln Thr Ser Arg
1660 ACG GAG ATC GAC CGA CTG CTT GAG CAA AAG CCA CCG TTA ACT GCT GAT CAG GCA TGG GAT GTT ATT CGC CAA ACC AGT CGT

581 Gln Asp Leu Asn Leu Arg Leu Phe Leu Pro Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ser Gly Leu Thr Gln Ser Asp Pro Arg Arg Gln
1741 CAG GAT CTT AAC CTG AGG CTT TTT TTA CCT ACT CTG CAA GCA GCG ACA TCT GGT TTG ACA CAG AGC CCG CGT CGT CAG

608 Leu Val Glu Thr Leu Thr Arg Trp Asp Gly Ile Asn Leu Leu Asn Asp Asp Gly Lys Thr Trp Gln Gln Pro Gly Ser Ala
1822 TTG GTA GAA ACA TTA ACA CGT TGG GAT GGC ATC AAT TTG CTT AAT GAT GAT GGT AAA ACC TGG CAG CAG CCA GGC TCT GCC

635 Ile Leu Asn Val Trp Leu Thr Ser Met Leu Lys Arg Thr Val Val Ala Ala Val Pro Met Pro Phe Asp Lys Trp Tyr Ser
1903 ATC CTG AAC GTT TGG CTG ACC AGT ATG TTG AAG CGT ACC GTA GTG GCT GCC GTA CCT ATG CCA TTT GAT AAG TGG TAC ACG

662 Ala Ser Gly Tyr Glu Thr Thr Gln Asp Gly Pro Thr Gly Ser Leu Asn Ile Ser Val Gly Ala Lys Ile Leu Tyr Glu Ala
1984 GCC AGT GGC TAC GAA ACA ACC CAG GAC GGC CCA ACT GGT TCG CTG AAT ATA AGT GTT GGA GCA AAA ATT TTG TAT GAG GCG

689 Val Gln Gly Asp Lys Ser Pro Ile Pro Gln Ala Val Asp Leu Phe Ala Gly Lys Pro Gln Gln Glu Val Val Leu Ala Ala
2064 GTG CAG GGA GAC AAA TCA CCA ATC CCA CAG GCG GTT GAT CTG TTT GCT GGG AAA CCA CAG CAG GAG GTT GTG TTG GCT GCG

716 Leu Glu Asp Thr Trp Glu Thr Leu Ser Lys Arg Tyr Gly Asn Asn Val Ser Asn Trp Lys Thr Pro Ala Met Ala Leu Thr
2146 CTG GAA GAT ACC TGG GAG ACT CTT TCC AAA CCG TAT GGC AAT AAT GTG AGT AAC TGG AAA ACA CCT GCA ATG GCC TTA ACG

743 Phe Arg Ala Asn Asn Phe Phe Gly Val Pro Gln Ala Ala Glu Glu Thr Arg His Gln Ala Glu Tyr Gln Asn Arg Gly
2227 TTC CGG GCA AAT AAT TTC TTT GGT GTA CCG CAG GCC GCA CCG GAA GAA ACG CGT CAT CAG CCG GAG TAT CAA AAC CCG GGA

770 Thr Glu Asn Asp Met Ile Val Phe Ser Pro Thr Thr Ser Asp Arg Pro Val Leu Ala Trp Asp Val Val Ala Pro Gly Gln
2308 ACA GAA AAC GAT ATG ATT GTT TTC TCA CCA ACG ACA AGC GAT CGT CCT GTG CTT GCC TGG GAT GTG GTC GCA CCC GGT CAG

797 Ser Gly Phe Ile Ala Pro Asp Gly Thr Val Asp Lys His Tyr Glu Asp Gln Leu Lys Met Tyr Glu Asn Phe Gly Arg Lys
2389 AGT GGG TTT ATT GCT CCC GAT GGA ACA GTT GAT AAG CAC TAT GAA GAT CAG CTG AAA ATG TAT GAA AAT TTT GGC CGT AAG

824 Ser Leu Trp Leu Thr Lys Gln Asp Val Glu Ala His Lys Glu Ser Gln Glu Val Leu His Val Gln Arg
2470 TCG CTC TGG TTA ACG AAG CAG GAT GTG GAG GCG CAT AAG GAG TCG CAG GAA GTG TTG CAC GTT CAG AGA TAA

HpaI

Figura 4. Secuencia nucleotídica del gene estructural de la penicilina G acilasa de *E.coli*. Las subunidades α y β son indicadas por una línea sobre la secuencia de aminoácidos. El péptido señal está localizado en el amino-terminal de la molécula precursora y el péptido conector entre las subunidades α y β (Schumacher et al. 1986).

Una vez sintetizado, el precursor PrePro PGA es dirigido hacia la membrana plasmática, donde comienzan los pasos de maduración de la enzima. Primero es reconocido el péptido señal por el sistema de translocación **Tat** (twin arginine translocation) ahí ocurre el primer corte, son entonces removidos los 26 aminoácidos (aa.) del péptido señal para dar forma a otro precursor llamado Pro PGA, el cual es translocado hacia el espacio periplasmático, donde se llevarán a cabo subsecuentes cortes proteolíticos para generar la proteína madura (Fig. 5).

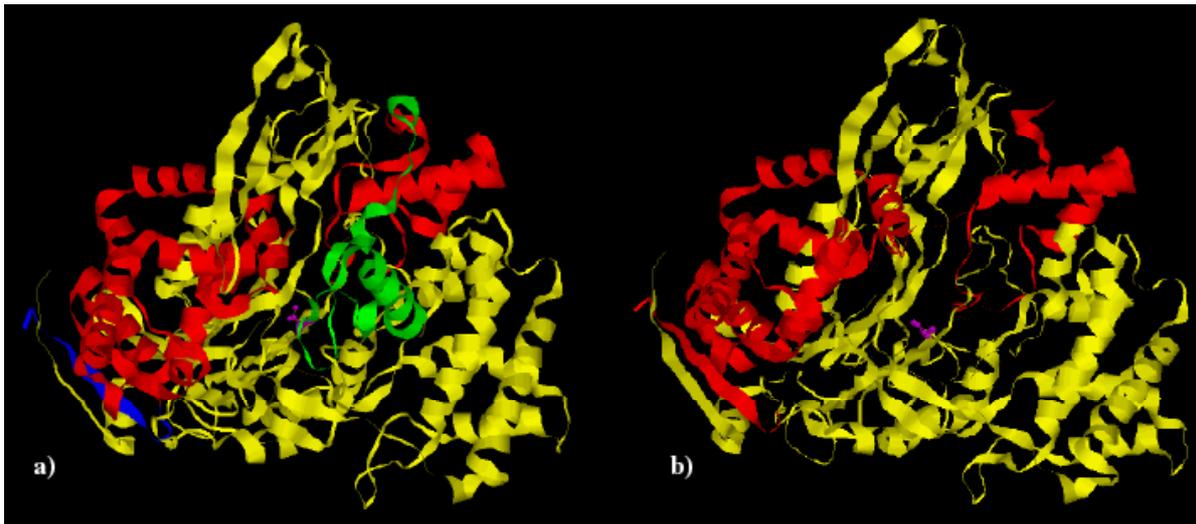


Figura 5. **a)** Estructura cuaternaria del precursor de PGA, donde el péptido señal es mostrado en azul, el péptido conector en verde (bloqueando el sitio activo), la subunidad α en rojo y la subunidad β en amarillo. **b)** estructura de PGA madura, mostrando las unidades estructurales secundarias para la subunidad α en rojo y la subunidad β en amarillo. La serina catalítica es mostrada en naranja (50,51).

Este último paso de la maduración de PGA, la unión de las subunidades α y β , es un proceso que aún no está completamente definido, sin embargo, se tiene pruebas de que:

- i)** La maduración de la enzima debe ocurrir durante el transporte a través de la membrana periplasmática o rápidamente después de la entrada a periplasma (9,10).
- ii)** El proceso comienza con una autoproteólisis intramolecular en el enlace Thr₂₆₃ – Ser₂₆₄, que expone a la serina catalítica (Ser_{1:B}), y deja libre la subunidad β (9).

- iii) El corte en el enlace Thr₂₆₃ y Ser₂₆₄ resulta en el inicio de la remoción del péptido conector, dejando libre el grupo amino primario de la Ser_{1:B}, que es el residuo catalítico de la enzima (6,9).
- iv) En la siguiente fase del procesamiento la cadena α es cortada en el carboxilo terminal por autoproteólisis intra e intermolecular, entre los residuos Ala_{235:A} y Ala_{236:A}, obteniendo finalmente la remoción del péptido conector (10).
- v) La unión de las subunidades α y β , se da por medio de interacciones no covalentes (6,7).
- vi) El corte autoproteolítico y el proceso de plegamiento se cree que ocurren concomitantemente con la unión de calcio a la enzima en el periplasma (Fig.6)(6,7).

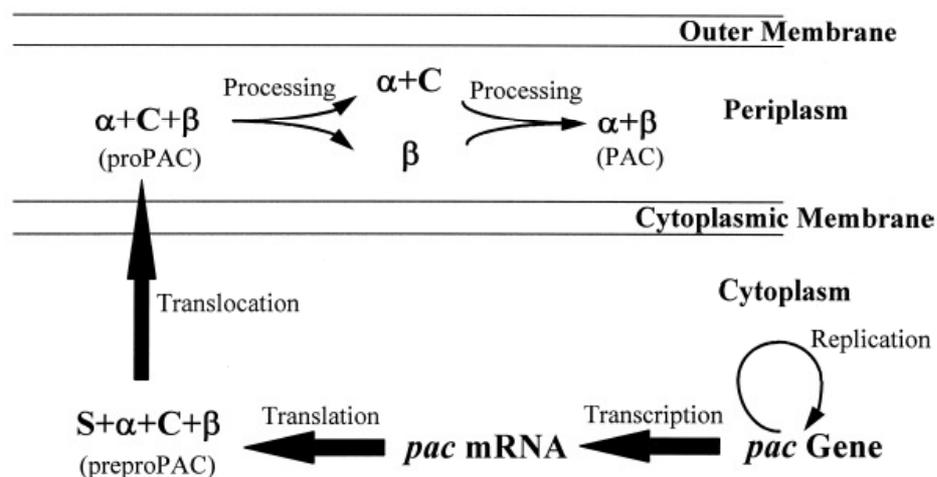


Figura 6. Síntesis y maduración de PGA en *E. coli*. El gene estructural *pac* codifica a un precursor polipeptídico (PreProPAC) de un peso molecular aproximado de 95 KDa, el cual está compuesto por un péptido señal (S), una subunidad α (α), un péptido conector (C) y una subunidad β (β). El péptido señal dirige la exportación de PreProPAC hacia el periplasma (vía sistema Tat) y es removido para formar otro precursor (ProPAC) después de la translocación. La proteólisis periplásmica remueve el péptido conector y las subunidades α y β se ensamblan para dar lugar a la proteína madura (Chou et al. 2000)

II.1.3 Mecanismo de acción

PGA hidroliza la cadena acilo de la penicilina G para dar como productos al ácido fenilacético (PAA) y al ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) (Fig. 7) (1,2,3)

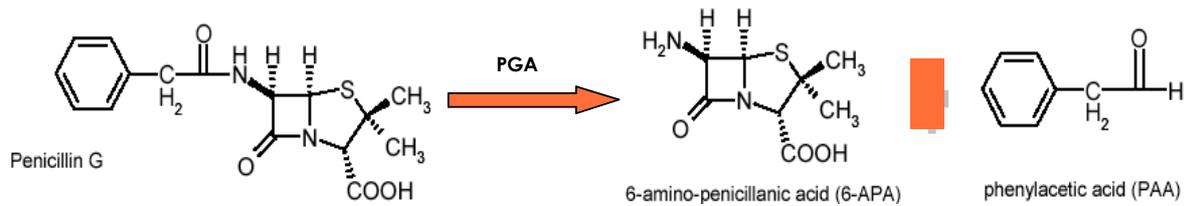


Figura 7. La hidrólisis de la penicilina G por la penicilina G acilasa da como productos ácido fenilacético (PAA) y ácido 6 aminopenicilánico (6 APA) (Valle et al. 1991).

El sitio de corte de PGA es en el enlace amida de la penicilina G, que esta entre el anillo aromático y la cadena lateral es. El sitio activo de PGA es una cavidad profunda bordeada por residuos de amino ácidos aromáticos donde se une el sustrato (Fig.8). Los residuos hidrofóbicos que forman la unión al grupo acilo en el sitio activo de la PGA son los principales contribuyentes en el reconocimiento de sustrato y su unión, resultando así la especificidad por la penicilina G.

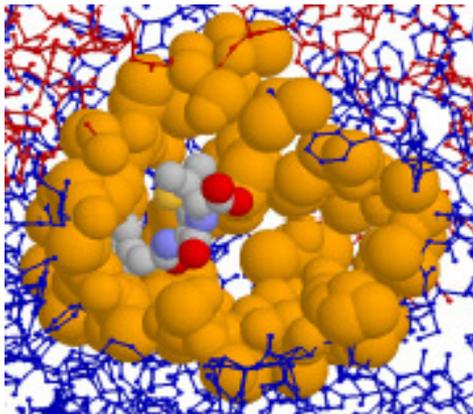


Figura 8. Estructura de PGA con la penicilina G en la cavidad de unión hidrofóbica, la cual es mostrada en naranja.

Se ha demostrado que la unión con el sustrato induce un cambio conformacional debido a interacciones estéricas entre el sustrato y el residuo Phe_{146:A}, formándose un plegamiento con conformación y abierta. El cambio conformacional involucra el desplazamiento de los residuos Phe_{146:A} y Arg_{145:A} del sitio activo por cerca de 3 y 8 Å respectivamente, reorientándolos hacia el solvente para formar una configuración abierta, permitiendo a la enzima acomodar a la penicilina G (6). Además, los residuos aromáticos Phe_{71:B} y Phe_{146:A}, junto con una vía de iones de calcio con coordinación geométrica típica, juegan un papel importante en la unión del sustrato (7). La enzima utiliza la unión de los iones de calcio con el borde del sitio activo para ayudar a definir la estructura del sitio activo y unir las cadenas α y β (7). Los residuos de la cadena β (Phe_{71:B}, Asp_{73:B}, Val_{75:B} y Asp_{76:B}) que coordinan los iones de calcio, son parte de una extensa llamada región β -loop y los residuos de la cadena α Phe_{146:A} y Glu_{152:A} son los responsables de la coordinación de calcio (7). La unión del sustrato a Phe_{24:B} Ser_{67:B} y Phe_{57:B} es por medio de puentes de hidrógeno. Además, se confirmó un papel crucial para la Asn_{2141:B} en la catálisis de penicilina G (6,7)).

El mecanismo por el cual PGA hidroliza a la penicilina G para producir PAA y 6-APA, es similar al de las serín proteasas sin la tríada catalítica. PGA casi siempre se parece a otras Ntn-hidrolasa por la presencia de una sola serina que es el punto focal en el centro catalítico. El plegamiento Ntn embebido en la cadena β de PGA provee la estructura sobre la cual la mayoría de los residuos catalíticamente importantes están distribuidos. La Ser_{1:B} en el amino terminal de la cadena β en el sitio activo funciona como nucleófilo y como base catalítica para aumentar la nucleofilicidad. La nucleofilicidad de la Ser_{1:B} es aumentada por su propio grupo α -amino y es posicionada por el Asn_{241:B}, lo cual le da el potencial catalítico a la serina. Asn_{241:B} actúa para posicionar el sustrato en el sitio activo y contribuye en la estabilización del oxianión (6).

El mecanismo de acción propuesto para PGA (fig. 9) comienza con un ataque nucleofílico por Oγ el grupo hidroxilo de la Ser_{1:B} al carbono del carbonilo del enlace amida, dando como resultado la formación de un oxianión en el estado de transición (8,34,35). El intermediario tetraédrico resultante es estabilizado a través de enlaces de hidrógeno del oxígeno cargado negativamente del intermediario con los residuos de estabilización del oxianión: Gln_{23:B}, Ala_{69:B} y ND1 de Asn_{241:B} (7,8,35). El colapso del estado de transición resulta en la formación de un intermediario acil-enzima y concomitantemente el primer producto, el ácido fenilacético es liberado del sitio activo. El intermediario acil-enzima es hidrolizado nuevamente vía ataque nucleofílico por el agua a través de un estado de transición similar, el segundo producto, el ácido 6-aminopenicilánico es liberado del sitio activo y la enzima es regenerada. El mecanismo de acción que involucra la formación de un intermediario covalente en PGA es similar al bien conocido mecanismo de las serín proteasas (6,7,35).

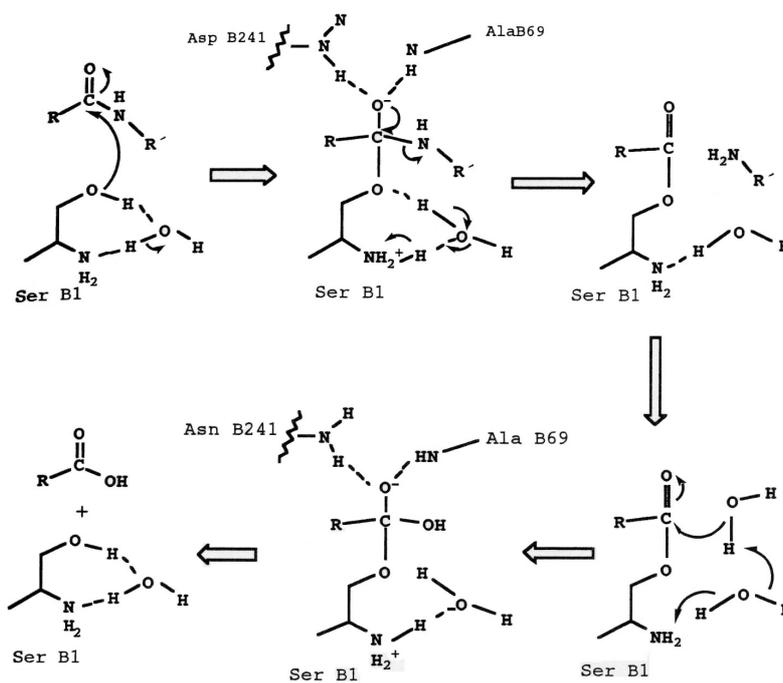
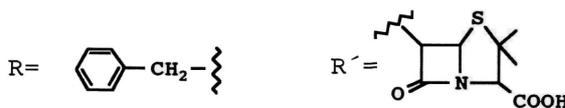


Figura 9. Mecanismo de acción de la penicilina G acilasa sobre la penicilina G



II.1.4 Regulación y pasos limitantes en la producción de PGA

Un aspecto muy importante que no debemos olvidar es que la actividad intracelular de PGA y la expresión de su gen *pac*, están bajo el control de varios reguladores, tales como: temperatura, nivel de oxígeno, represión catabólica e inducción por PAA (12-14).

Dado que la enzima sufre un procesamiento complejo para ser madura, los elementos regulatorios pueden actuar a diferentes niveles incluyendo transcripción del gen *pac*, traducción, transporte y maduración de PGA (11,15,16).

Varios grupos han trabajado para determinar la regulación del gen *pac*, pero ahora se ha visto que es mucho más compleja de lo que se pensaba al principio y por eso se pueden explicar las discrepancias que se han encontrado en los reportes.

Valle et al (12) secuenciaron la región 5' no codificante y con esto determinaron el punto de inicio transcripcional (+1) 30 nucleótidos antes del punto de inicio traducional; encontraron una posible secuencia -35 (TAGATA) y una posible secuencia -10 (TAGTAT), dos posibles sitios de unión a CRP (Proteína Receptora de cAMP), así como tres secuencias palindrómicas que pueden estar involucradas en la regulación transcripcional. Posteriores experimentos revelaron que: **i)** la expresión de PGA es mínima cuando la glucosa es usada como fuente de carbono; **ii)** una fuente de carbono alternativa tal como el glicerol, incrementa la expresión de PGA; **iii)** la expresión de PGA es máxima cuando PAA es usado como única fuente de carbono; **iv)** PAA puede inducir actividad aún cuando glucosa o glicerol sean adicionados al medio. Los datos anteriores y otras observaciones les permitieron concluir que la inducción por PAA y la represión catabólica por glucosa deben estar involucradas en la regulación de *pac* a nivel transcripcional y que la glucosa y PAA pueden regular simultáneamente la expresión de PGA. Realizaron también análisis computacionales buscando

posibles promotores de σ^{70} con lo cual lograron identificar 4 posibles promotores río arriba del gene estructural.

Oh et al. (13) también han trabajado tratando de encontrar la forma en que es regulado el gen *pac*, han descrito un promotor con las secuencias TTGCTA y TATACA para las cajas -35 y -10 respectivamente, las cuales están localizadas río arriba del sitio de restricción *HindIII*, justo a 6 pb río abajo del propuesto por Valle et al. (12).

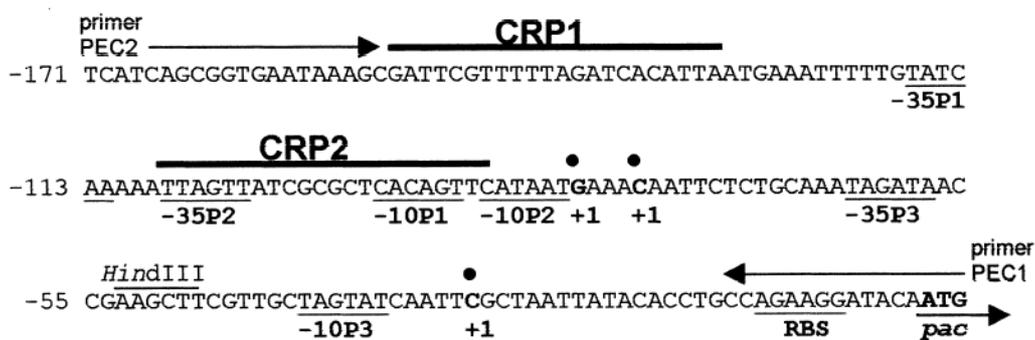


Figura 10. Secuencia de la región 5' no codificante del gene *pac* de *E. coli*. CRP1 y CRP2 indican posibles sitios de unión de CRP (proteínas receptoras de AMPc). Las cajas -35 y -10 de los promotores P1, P2 y P3 se encuentran subrayados. El ATG en negritas indica el sitio de inicio de la traducción del gene *pac*. Rbs indica el sitio de unión a ribosoma y el +1 indica el sitio de inicio de la transcripción de los diferentes promotores (Roa et al. 1999)

Roa et al. (14) sugieren que la región hasta 170 pb río arriba del gen estructural *pac* contienen las señales regulatorias requeridas para el control de la expresión del gen *pac*. Los análisis de "primer extensión" mostraron que la transcripción del gen *pac* puede ser iniciada desde tres promotores diferentes, a -81 pb (promotor P1) a -77 pb (promotor P2) y -30 pb (promotor P3) río arriba del ATG de inicio. Río arriba del sitio de inicio podemos encontrar las secuencias correspondientes a las cajas -35 y -10 (TATCAA y CACGAT; TTAGTT y CATAAT; y TAGATA y TAGTAT) de los posibles promotores P1, P2 y P3 respectivamente (fig. 10). Observaron que los 3 promotores son funcionales, pero que su actividad depende del gen *pac*, y que una delección cercana a la caja -10 de P3 da una expresión constitutiva,

indicando que es requerida para la inducción por PAA, lo que sugiere que la expresión de *pac* es regulada por un mecanismo de represión y que las proteínas receptoras de cAMP están involucradas no sólo en la represión por glucosa sino en la inducción por PAA (14).

Ahora trataremos el nivel tradicional; en *E. coli* la traducción puede estar limitada por varios factores que incluyen la eficiencia en la iniciación de la traducción, el número de ribosomas viables y/o tRNAs, la estructura secundaria y/o estabilidad de los mRNAs (15). La eficiencia de iniciación es afectada por los nucleótidos cercanos al ATG de iniciación, la secuencia de nucleótidos del sitio de unión al ribosoma y el espacio entre el sitio de unión al ribosoma y el codón de inicio. Aunque el triplete "AAA" adyacente al ATG de inicio del gen *pac* puede tener efectos positivos en la expresión del gen, el espacio de tan sólo 4 pb. entre el sitio de unión a ribosoma y el ATG de inicio, tiende a limitar la eficiencia del inicio de la traducción (15). Otro punto de control en la producción de PGA es el nivel post-traducional, dado que puede observarse la formación de cuerpos de inclusión, es decir, la agregación de precursores citoplasmáticos y periplasmáticos (15). Scherrer et al. (44) encontraron cuerpos de inclusión sólo en el periplasma, pero Sriubolmas et al. (45) encontraron agregados de proenzima en periplasma y agregados de preproenzima en el citoplasma. El porque se forman los cuerpos de inclusión esta relacionado directamente con la eficiencia del sistema de transporte y la unión de las subunidades (17).

II.1.5 Estrategias para aumentar la producción de PGA

Aunque PGA ha sido utilizada en la industria durante décadas y diversas estrategias de expresión basadas en tecnología de ADN recombinante constantemente se han desarrollado, en una revisión de Shewale y Sivaraman (46) se indica que estos avances en ingeniería genética han dado como resultado un incremento de 2 a 150 veces la producción de la enzima, que aún así necesita ser mejorada (15,16).

En lo que se tiene que trabajar para mejorar la producción de PGA es en los puntos limitantes, así las estrategias desarrolladas se enfocan en los siguientes aspectos:

i) Diseñar un vector el cual tenga una o más modificaciones que eliminen alguno de los pasos limitantes ya sea a nivel transcripcional, traduccional, o post-traducional.

ii) Desarrollo de un huésped sobreproductor de PGA.

iii) Utilización de una tecnología de cultivo eficiente para la producción de PGA (2,11,15,16).

Vector

Una estrategia ampliamente empleada para la sobreproducción de PGA es el diseño de vectores con diversas modificaciones, tales como:

- El uso de plásmidos multicopia (2,15).
- El uso de promotores fuertes, por ejemplo *tac* y *trc*, que actúan a nivel transcripcional (2,15).
- La modificación en la distancia entre el sitio de unión a ribosoma y el ATG de inicio (15).
- Eliminar el procesamiento proteolítico, para obtener directamente una proteína madura (4).

Chou et al. (16) han desarrollado varios vectores con modificaciones con los que obtuvieron un aumento en la eficiencia a nivel traduccional y transcripcional, pero observaron que sus modificaciones no son suficientes, ya que se formaron cuerpos de inclusión, lo que nos permite ver que sigue habiendo un paso o varios pasos limitantes a nivel post-traducional (11,15,16).

Flores et al.(4) hicieron algo sumamente interesante, esto es, diseñaron una PGA por medio de una permutación circular, que no necesita del procesamiento autocatalítico para remover el péptido conector y producir la enzima activa, pero la limitante en este caso también fue la translocación hacia el periplasma.

Huésped

Dentro de los sistemas utilizados con eficiencia en la recuperación de la enzima activa ha sido la expresión en levaduras, la más exitosa ya que la proteína es excretada al medio, en contraste con los sistemas bacterianos en donde la enzima es retenida en el periplasma (40).

Con el fin de encontrar cepas que produzcan una mayor cantidad de proteína activa o con cambio de especificidad, se han usado agentes mutagénicos como son radiación UV, N-metil N-nitrosoguanidino (MNNG), etilmetanosulfonato (EMS), así como la selección en diferentes fuentes de carbono o nitrógeno. Dentro de estas estrategias está aquella desarrollada por Chou et al. (16) para seleccionar una cepa de *E. coli* conveniente para la producción de PGA; crearon una novedosa estrategia, basada en el hecho de que PGA hidroliza a la penicilina G, por lo tanto aquellas mutantes que resistieran a mayores concentraciones de penicilina G son superproductoras de PGA. Así obtuvieron un par de cepas superproductoras denominadas MD Δ P7 y MF Δ P1 (16).

Cultivo

Una buena opción es el cultivo de alta densidad celular ("feed-batchcultivation") en el cual el biorreactor tiene un flujo constante de medio. El primer paso en esta operación es el desarrollar una estrategia de alimentación óptima, donde las células puedan ser mantenidas en un estado de alta energía para aumentar la producción de la proteína recombinante, ya que la densidad celular es aumentada (19).

Se debe considerar que:

- La síntesis de la enzima es favorecida a temperaturas bajas, y que los cultivos deben de incubarse a menos de 30° C, lo cual no es óptimo para las bacterias (40).
- La glucosa es una buena fuente de carbono para favorecer el crecimiento de *E. coli*, pero la síntesis de PGA es reprimida catabólicamente por ésta (13,40).
- Los medios son suplementados con PAA para inducir la producción de PGA, pero esta adición afecta el crecimiento de *E. coli* (40).
- Se ha visto que la sobreproducción de PGA afecta negativamente el crecimiento de *E. coli*.

II.2 Sistema de translocación Tat

El sistema Tat opera en las membranas tilacoidales de los cloroplastos de eucariontes y en las membranas plasmáticas de una amplia variedad de procariontes, tiene la capacidad de transportar proteínas plegadas a través de las membranas cerradas herméticamente y no parece requerir de la hidrólisis de nucleótidos trifosfatados en ningún paso del proceso (20).

La mayoría de los sustratos del sistema de translocación Tat son proteínas que contienen cierto tipo de cofactores activos redox, los factores asociados a este sistema son aquellos que tienen grupos metal-sulfuro o nucleótidos (21).

II.2.1 El péptido señal

Las proteínas que son exportadas por la vía Tat son reconocidas por el péptido señal en el amino terminal de la proteína precursora. El péptido señal está constituido por una región básica (n) en el amino terminal, que es seguida por una región hidrofóbica (h) y luego sigue una región en el extremo carboxilo terminal (c), que contiene el sitio de reconocimiento para el corte de la peptidasa. El péptido señal de Tat contiene una secuencia en el límite de la región n y la región h, esta secuencia puede ser definida como **S R R x F L K**. Las argininas (**R**) son casi siempre invariantes, la frecuencia de otro residuo en el motivo es mayor que 50% y **x** normalmente es un aminoácido polar. La conservación de las dos argininas es lo que le da el nombre al sistema **twin arginine translocation** (Fig. 11)

MTNKISSSDNLSNAVSATDDNASRTPNLT RR ALVGGGVGLAAAGALASGLQ	Gfo
MNNEETFYQAMRRQGV TRRSFL KYC SLA ATSLGLGAGMAPKIAWA	HyaA
MNNNDLFQ ASRRRFL AQLGGLTVAGMLG P SLLP RR RATAAQA	TorA
MDV SRR Q FF KICAGCMAGTTVAALGFAPKQALA	FdnG
MSL SRR Q FI QASGIALCAGAVPLKASA	SufI
MKTKIPDAVLA AEVSR RGLV KTTA IGGLAMASSALTLEFSRIAHA	DmsA
MKN R RMIVNCVTASLMYYW SL PALA	ppPA
SRRxFLK	
consensus	

Figura 11. Ejemplos de los péptidos señales de Tat. Gto, glucosa-fructosa oxireductasa de *Zimomonas mobilis*; HyaA, subunidad pequeña de la hidrogenasa-1; TorA, trimetilamina N-oxido reductasa; FdnG, subunidad catalítica de la formato dehidrogenasa-N; SufI, función desconocida; DmsA, subunidad catalítica de la dimetilsulfoxido reductasa; prepropenicilina acilasa, estas últimas son de *E. coli*. Los residuos que corresponden al motivo "twin-arginine" se encuentran en negritas (Palmer et al. 2003).

Algunos experimentos de mutagénesis sitio dirigida han confirmado que los residuos de arginina del motivo consenso juegan un papel clave en el proceso de exportación. Aunque se ha visto que la sustitución de la primera o segunda arginina del péptido señal en la proteína pre-Sulf de *E. coli* por lisina aún presenta exportación, cuando se sustituye por alanina esto ya no ocurre. Se ha identificado que de manera natural ocurre una sustitución de arginina por lisina en la primera posición. Además se sabe que la PGA de *E. coli* es exportada vía el sistema de secreción Tat, sin presentar un motivo obvio "twin arginine" (21 y 22).

Los residuos básicos son necesarios para el transporte dependiente de Tat en la posición de la primera arginina en Tor A, y residuos como asparagina o glutamina son tolerados en la posición de la segunda arginina. Estas observaciones pueden contar para que se dé el reconocimiento del sistema Tat y el péptido señal de PGA, el cual es plausible como un motivo arginina-glutamina en las posiciones de las argininas consenso (21,20).

Además del motivo twin arginine, el péptido señal tiene una fenilalanina consenso, es el aminoácido más conservado en el motivo Tat, su sustitución por leucina no tiene efecto, pero una alanina o tirosina lleva a un dramático decremento en la tasa de exportación, sugiriendo que la hidrofobicidad del aminoácido en esta posición es importante para el proceso de exportación (21).

La leucina consenso sólo contribuye en la eficiencia de la exportación, ya que la sustitución por un residuo no hidrofóbico resulta en un pequeño decremento en dicha tasa. Una observación sorprendente es que la sustitución de la lisina del motivo incrementa la tasa de exportación, lo que lleva a especular que el papel de la lisina puede ser el de mediar las interacciones con las proteínas accesorias necesarias que aseguran que la inserción del cofactor ha sido llevada a cabo (21).

II.2.2 Componentes de Tat

Los dos loci que codifican para los componentes de la maquinaria Tat han sido identificados en *E. coli*. El operón *tatA*, está mapeado en el minuto 86 en el cromosoma de *E. coli* y codifica para 4 genes *tatA*, *B*, *C* y *D*, mientras que el loci monocistrónico *tatE* se encuentra mapeado en el minuto 14. Ambas unidades transcripcionales son expresadas constitutivamente, indicando un requerimiento de Tat bajo todas las condiciones de crecimiento (21) (Fig. 12)

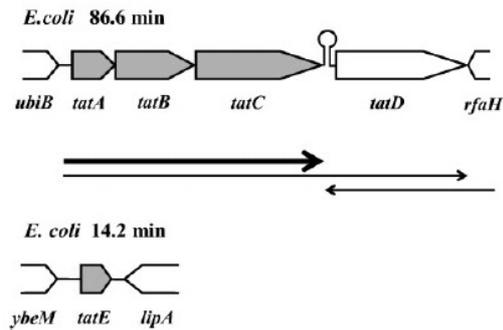


Figura 12. Organización cromosomal de los genes que codifican para los componentes de Tat (gris). En *E. coli*, el operón *tat A* (arriba) codifica para cuatro genes *tat A*, *B*, *C* y *D*, entre *tat C* y *D* posiblemente hay una estructura tallo-asa, que permite la regulación de *tat D*. Abajo encontramos al monocistrónico *tat E* (Palmer et al. 2003).

Los genes *tatA*, *B*, *C*, *D* y *E* son traducidos a las proteínas TatA, B, C, D y E respectivamente. TatA, TatB y TatE son proteínas homólogas con una estructura común; y las predicciones indican que pueden ser proteínas transmembranales, con una α hélice en el amino-terminal, seguida de una hélice anfipática localizada en el lado citoplasmático de la membrana y una región carboxilo-terminal de longitud variable. TatA y TatE tienen más del 50 % de identidad de secuencia y muestran tener funciones sobrelapadas en la exportación de proteínas dependientes de Tat. Deleciones en *tatA* o *tatE* llevan a un decremento en la translocación a través de Tat y una deleción de ambos es requerida para observar un bloqueo total de la vía de transporte. Generalmente la deleción de *tatA* muestra un efecto mayor en el decremento en el transporte que la deleción de *tatE*; esto concuerda con estudios genéticos que muestran que *tatA* es transcrita y traducida de 50 a 100 veces más que *tatE*. A pesar de que TatB tiene 20 % de identidad con TatA y TatE, tiene una función diferente en la vía de exportación, ya que la deleción de TatB por sí sola es suficiente para abolir por completo la exportación de sustratos para Tat (21).

La proteína TatC es altamente hidrofóbica y se predice que posee 6 hélices transmembranales, con las hélices amino y carboxilo terminales localizadas en la cara citoplasmática de la membranas, aunque sólo se han logrado detectar 4 de estas hélices transmembranales. TatC es estrictamente requerida para la exportación por el sistema Tat. De todos los componentes de la vía esta proteína es la que preserva el más alto nivel de conservación de aminoácidos (21).

Finalmente, *tatD* codifica para una proteína citoplasmática con actividad de nucleasa. La familia de las TatD no juega un papel obligado en la exportación dependiente de Tat. *tatD* es transcrito junto con *tatA*, *B* y *C*, y la presencia de una posible estructura de tallo-asa en la región intergénica *tatC-tatD* sirve para reprimir el nivel de síntesis de TatD (21) (Fig. 13).

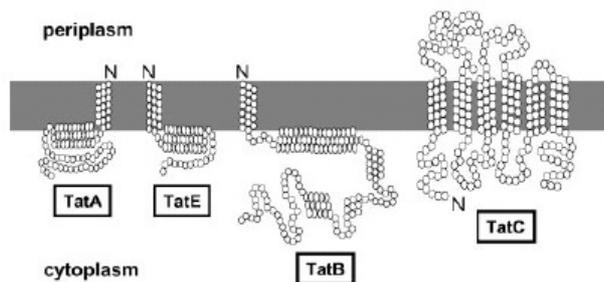


Figura 13. Predicción de la organización topológica de los componentes del sistema de translocación Tat en *E. coli*. El amino-terminal de cada polipéptido es marcado como N (Palmer et al. 2003).

II.2.3 Funciones de los componentes de Tat

Las funciones de cada proteína del sistema Tat en la vía de exportación son pobremente comprendidas. Se ha predicho que las proteínas TatA, B y E actúan como receptores de membrana para los sustratos de Tat o para formar el canal de exportación, mientras que se han demostrado ambos papeles para la proteína TatC (21,24).

Se determinó, por medio de co-inmunoprecipitación de las proteínas TatA, B y C de las membranas de *E. coli* solubilizadas y también por medio de cromatografía, la presencia de un complejo con una masa molecular de ~600 KDa. Este complejo está compuesto principalmente por TatB y C, junto con una pequeña proporción de TatA. Dado que TatC es la proteína que contiene la más alta cantidad de aminoácidos conservados, podría formar el sitio de unión al motivo Twin Arginine de los péptidos señales de los sustratos del sistema Tat. (21,23,25).

La mayor parte de la proteína TatA forma otro complejo de TatA/B, que tiene una masa molecular de ~600 KDa y contiene un exceso molar de TatA sobre TatB de aproximadamente 20 veces. Una estructura cilíndrica con una cavidad de ~70 Å de diámetro se ha observado por medio de microscopía (Fig. 14), que puede corresponder al canal de transporte (21, 24).

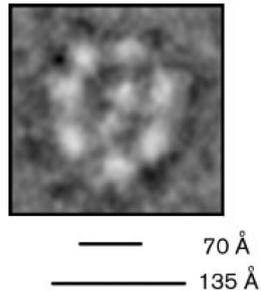


Figura 14. Proyección de estructuras del complejo TatA/B de *E. coli*. Solubilizado y purificado con detergente CHAPS. Se observa la formación de una estructura cilíndrica, compuesta principalmente por TatA (Sargente et al. 2001).

II.2.4 Eliminación del sistema Tat

Se ha predicho que proximadamente el 20 % de todas las proteínas sintetizadas por *E. coli* están localizadas fuera del compartimiento citoplasmático. Se ha identificado que más de 20 productos génicos son exportados por medio de Tat. De ahí el que los genes que forman el sistema de transporte Tat sean expresados constitutivamente, indicando un requerimiento de dicha maquinaria bajo todos los regímenes de crecimiento (26, 29).

Se ha reportado que la pérdida de los genes que codifican para los componentes esenciales de Tat, hace que se formen cadenas de más de 10 células (Fig. 15), lo cual hace pensar que son defectuosas en la separación celular. Se ha observado por microscopía electrónica que este fenotipo es similar al observado en la mutante *lpxC (envA)* que muestra un defecto en la síntesis del lípido A en la membrana exterior. Consistente con esto, las mutantes en Tat son hipersensibles a drogas hidrofóbicas y a lisis inducida con lisozima en ausencia de EDTA (26).

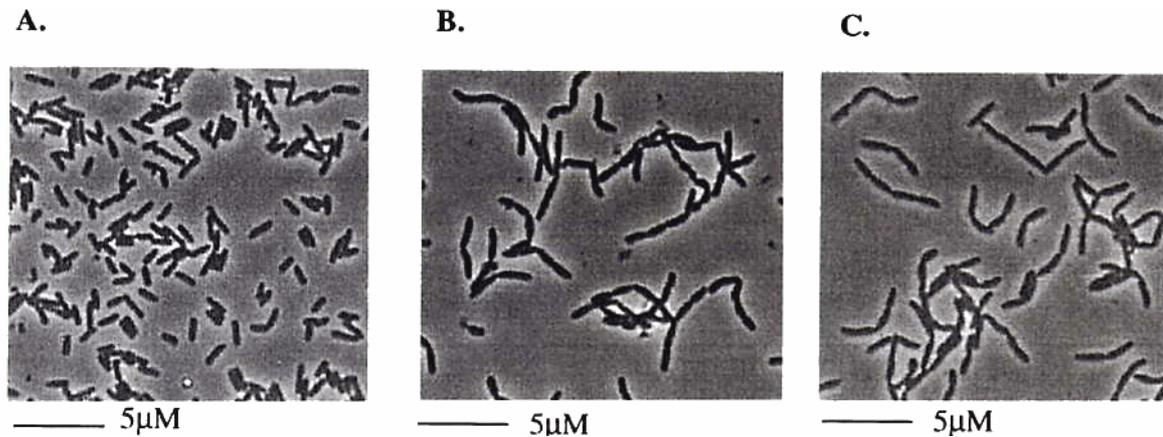


Figura 15. Análisis por microscopía de las cepas **a)** MC4100 (Cepa parental), **b)** JARV15 (Δ *tatAE*) y **c)** BILKO (Δ *tatC*), revelan que las células defectuosas en Tat presenta un defecto en la división celular (Sargent et al. 2001).

Δ Tat muestra un defecto en la división celular

Las cepas mutantes forman cadenas de más de 10 células, esta formación se produce independientemente al tipo de crecimiento (aerobio o anaerobio) y a la temperatura. Células con eliminación de los genes *tatAE* (fig 15b), *tatC* (Fig.15c) o *tatB*, que bloquean completamente el sistema Tat muestran el mismo fenotipo. Por otro lado, la delección de los genes *tatA* y *tatB* por separado, lo cual produce un bloqueo incompleto, muestran un fenotipo de formación de cadenas de máximo 4-5 células (26, 27).

Δ Tat muestran hipersensibilidad a antibióticos y detergentes

La sensibilidad de las cepas Δ *tatB* y Δ *tatC* a antibióticos tales como eritromicina, rifampicina y ampicilina es mayor a la presentada por la cepa parental, sugiriendo que la barrera de permeabilidad de la membrana exterior está comprometida. Esta inferencia es apoyada por la observación de que las Δ Tat son sensibles a detergentes aniónicos (SDS), pero no a surfactantes no iónicos (Triton X-10) (26,27).

Cepas Δ Tat sensibles a lisozima

EDTA es requerido para quelar cationes metálicos divalentes que sirven para estabilizar la estructura de los lipopolisacáridos (LPS) y permitir el acceso de la lisozima al sáculo de murina subyacente. Para la lisis de las células parentales se tubo que utilizar EDTA y lisozima, mientras las células Δ tat^{AE} y Δ tat^C mostraron una rápida y dramática lisis bajo la adición de únicamente lisozima (26), lo cual indica que la envoltura celular en las cepas Δ Tat tiene defectos.

Ize et al. (27) describen el aislamiento de mutantes por transposon de la cepa Δ tat^C que mantienen una translocación defectuosa en Tat, pero que tienen una variación en el grado de integridad de su membrana externa, la cual fue determinada por su resistencia a detergentes. Aquellas mutantes que tenían una mayor resistencia a detergentes se observó que sobrerregulan la expresión de genes que codifican proteínas de la pared celular (AmiB, AmiA y AmiC). AmiA y AmiC resultaron ser las responsables del defecto en la envoltura celular de las cepas mutantes en Tat (26,27).

II.3 Diferencias entre los sistemas de translocación Tat y Sec

El sistema de translocación Tat está localizado en la membrana citoplasmática bacteriana y opera de manera paralela a Sec. En la vía Sec, después de emerger del ribosoma, las preproteínas se unen a la proteína SecB, la cual previene el plegamiento. Luego es transferido a la proteína SecA, la cual dirige la translocación dependiente de ATP a través del complejo SecYEG, después del cual el precursor es procesado a su forma madura y es plegado.

En contraste, en la vía Tat, la mayoría de los sustratos unen cofactores redox y funcionan en el citoplasma. Después de la síntesis en el citoplasma, las proteínas transportadas por Tat están listas para plegarse y unir su cofactor, después la

proteína es transferida a través del aparato Tat en una forma plegada, usando como fuerza motriz una diferencia en el gradiente de protones (ΔpH) y no por la hidrólisis de ATP. Finalmente es procesada para dar lugar a su forma madura (20,21).

Los péptidos señales de ambas vías están divididos en tres regiones:

- Región n, una región amino-terminal básica.
- Región h, una región central la cual es hidrofóbica.
- región c, una región carboxilo terminal que contiene el sitio de reconocimiento de la peptidasa de la señal.

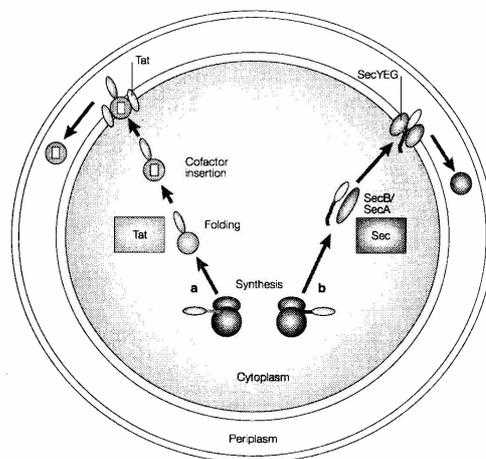


Figura 16. **a)** vía Tat, donde los sustratos están plegados y unen su cofactor (cuadro blanco), después la preproteína es translocada por medio de Tat de manera plegada y es procesada para dar lugar a la forma madura. **b)** en la vía Sec, la preproteína se une a SecB, que previene el plegamiento, luego se une a SecA, que dirige la translocación dependiente de ATP a través del complejo SecYEG, después es procesada y plegada (Robinson et al. 2001).

Entre los péptidos señal de estas vías encontramos algunas diferencias:

- i) El péptido señal de Tat contiene una secuencia de aminoácidos conservada entre la región n y la región h. Este motivo es definido como: S-R-R-x-F-L-K, donde R-R es lo más conservado.
- ii) La región h en los péptidos señales Tat son significativamente menos hidrofóbicos que los de Sec. Un incremento en la hidrofobicidad de la región h resulta en una re-dirección en la exportación de Tat hacia Sec, aunque el motivo R-R se mantenga intacto.

- iii) Los péptidos señales de Tat frecuentemente tienen residuos básicos en la región c, mientras que estos aminoácidos no son encontrados en la posición equivalente en Sec, estas cargas positivas actúan como señales de anulación de Sec.
- iv) Los péptidos señales de Tat son marcadamente más grandes que su contraparte en Sec, en muchos casos hasta por 58 aminoácidos en longitud, de los cuales su mayoría son atribuidos a una extensión en la región n (20,21,31).

II.4 Relación de PGA con los antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) forman una familia que tienen en común un anillo β -lactámico. Al inhibir a las enzimas transpeptidasas, ambos antibióticos interfieren en la biosíntesis del peptidoglicano, el mayor constituyente de la pared celular bacteriana (40).

Debido al uso indiscriminado de estos antibióticos durante las últimas décadas, se han seleccionado cepas resistentes a ellos, de ahí la necesidad de crear nuevos antibióticos que los sustituyan. El mecanismo más común de resistencia bacteriana a éstos antibióticos es la inactivación de éstos por la ruptura del enlace amídico del anillo β -lactámico mediante las enzimas β -lactamasas (40).

II.4.1 Antibióticos β -lactámicos semisintéticos

Este grupo de antibióticos se puede dividir en dos grupos, las penicilinas (penicilinas semisintéticas [SSPs], por ejemplo amoxicilina y ampicilina) que tienen un anillo β -lactámico fusionado a un anillo de cinco miembros llamado tiazolidino. Y las cefalosporinas (cefalosporinas semisintéticas [SSCs], por ejemplo cefadroxil y

cefalexin) cuyo anillo β -lactámico está fusionado con un anillo de seis miembros llamado 1,3-tiazina (40).

En la producción industrial de los antibióticos semisintéticos la conversión química tradicional de la penicilina G a 6-APA, ha sido reemplazada por procesos catalizados por enzimas. Algunas compañías han reemplazado la hidrólisis química de compuestos químicos y solventes costosos altamente contaminantes por la penicilina acilasa que cataliza la hidrólisis en un medio acuoso. A pesar de que se conoce desde hace cinco décadas que la penicilina acilasa rompe a la penicilina G en 6-APA y PAA (fig. 7), sólo en la última década ha sido introducida en los procesos industriales. Uno de los principales problemas han sido la producción de la enzima activa. El 6-APA es un intermediario que se utiliza en la preparación de las penicilinas semisintéticas y de ahí entonces el interés en mejorar su producción (30,35).

Por medio de las enzimas, la obtención de antibióticos semisintéticos se lleva a cabo mediante la hidrólisis de penicilina G (fig. 17:E1) o cefalosporina G por la penicilina acilasa, con el fin de obtener el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) ó el ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA). Posteriormente son transformados en penicilinas semisintéticas (SSPs) y cefalosporinas semisintéticas (SSCs), mediante la condensación con D-(-)-fenilglicina o derivados de D-(-)-4-hidroxifenilglicina, por síntesis química, respectivamente (fig. 17:Q3, Q4). Recientemente se ha intentado sustituir estos últimos pasos por una etapa de condensación asistida por la propia penicilina acilasa en procesos de producción de antibióticos de gran valor comercial como son (30):

- amoxicilina,
- ampicilina,
- cefaclor,
- cefadroxil
- y cefalexin (fig. 17:E3, E4)

Por otro lado, para obtener la cefalosporina G se necesita de la expansión de su anillo tiazolidino a un anillo de tipo 1, 3-tiazina (fig. 17:Q1, E5) que puede ser transformado por síntesis química o por la enzima expandasa. Por un mecanismo similar y dos pasos extras de síntesis química, la penicilina G se puede transformar en cefalosporina C, otro intermediario en la fabricación de antibióticos cefalosporánicos, (fig. 17:Q1, E5). A partir de la hidrólisis química de la cefalosporina C se puede obtener 7-ACA, que es un intermediario muy parecido al 7-ADCA que se utiliza también como precursor para antibióticos β -lactámicos semisintéticos (30).

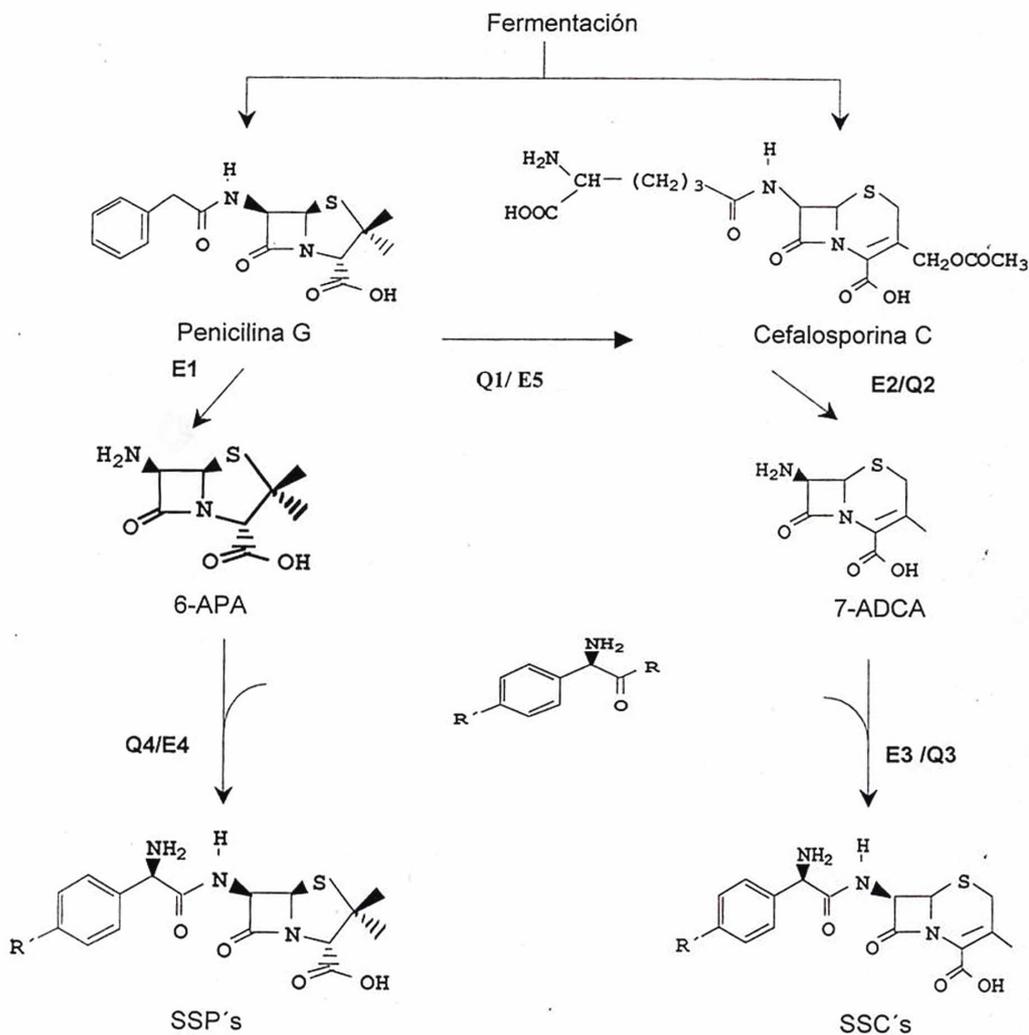


Figura 17. Obtención de los antibióticos β -lactámicos semisintéticos, los principales intermediarios son ácido 6-aminopenicilánico y ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico. La condensación con D-(-)-fenilglicina o un derivado de D-(-)-4-hidroxifenilglicina, por medio de enzimas (E) o de procesos químicos (Q) (Brugginn et al., 1998).

III Antecedentes

Tomamos como base para la realización de este proyecto tres antecedentes, el primero corresponde a mutaciones en el péptido señal de penicilina G acilasa, el segundo a un novedoso método de mutagénesis a nivel de codón y el tercero al sistema de selección.

III.1 Selección de PGA por el sistema Tat

Ignatova y colaboradores (22) diseñaron 3 variantes con reemplazos de aminoácidos en el extremo amino del péptido señal (fig. 18A), estudiaron su translocación por experimentos de pulso y caza (fig. 18B) y midieron la cantidad de proteína madura tanto en la cepa *E. coli* MC4100 como en la cepa JARV15, la cual contiene una delección de *tatA* y *tatB* (figura 18 C).

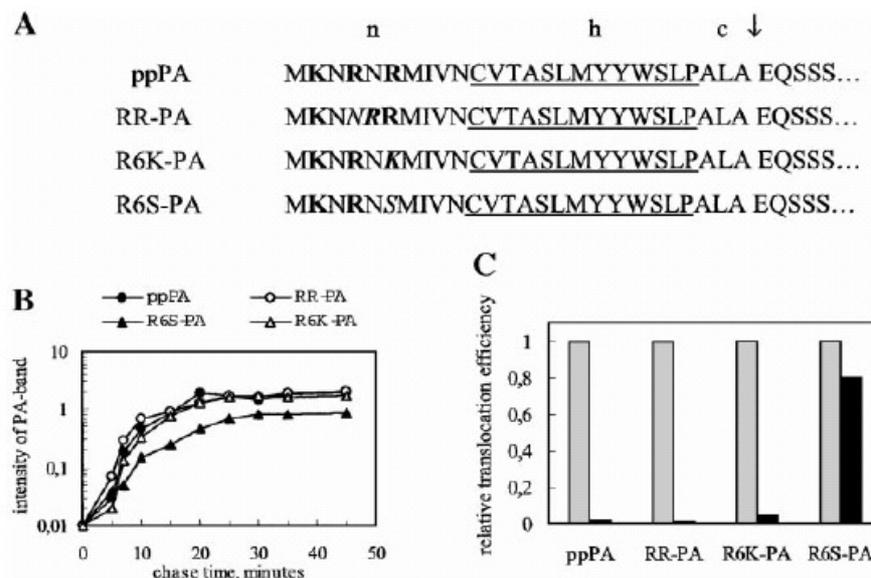


Figura 18. Análisis de la exportación de péptidos señal de ppPGA mutantes. (A) secuencia de aminoácidos del péptido señal de ppPGA y los péptidos señal diseñados. Los residuos introducidos por mutagénesis se encuentran en cursivas. El sitio de corte esta marcado como una flecha. (B) Análisis de pulso y caza *in vivo* de la exportación de precursores de PGA en la cepa *E. coli* MC4100, cada punto en la gráfica representa la intensidad de PGA madura en autorradiogramas. (C) Eficiencia de translocación relativa de los péptidos señal estimada por la intensidad de la cadena β de PGA por Western blot, expresada en la cepa *E. coli* MC4100 (gris) y en JARV15 (Δ *tatA* Δ *tatB*) (Ignatova et al. 2002).

Los autores observaron que la translocación de las variantes RR-PA y R6K-PA es similar a la translocación de la proteína silvestre (ppPA), mientras que la translocación de R6S-PA fue menor que ppPA. La translocación de RR-PA fue completamente bloqueada en la cepa que tiene la delección en *tatA* y *tatB*, la exportación de R6K-PA fue bloqueada de forma similar. Sin embargo en R6S-PA se retarda la translocación del precursor en la cepa con la delección en *tatA* y *tatB*. Esto hace pensar que la mutación R6S-PA puede redirigir al péptido señal hacia el sistema de transporte Sec.

Después construyeron dos híbridos de péptido señal de OmpT que dirige hacia Sec y PGA, sustituyendo la región n o hc del péptido señal de PGA con la región correspondiente de la secuencia señal de OmpT (fig. 19A). Experimentos de pulso y caza demostraron que los dos híbridos son exportados hacia el periplasma en el mismo tiempo que ppPGA en *E.coli* MC4100. En la cepa JARV15 la exportación de los precursores híbridos fue retardada, la construcción nOhcP-PA fue exportada más eficientemente que nPhcO-PA (fig. 19B)

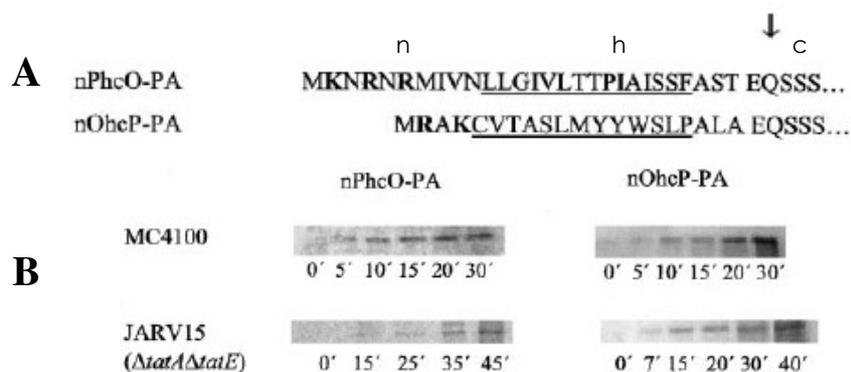


Figura19. Análisis de pulso y caza de las tasas de traslocación de los péptidos señal híbridos (Ignatova et al., 2002).

El trabajo concluye que: i) Las argininas, aunque no sean consecutivas en el péptido señal de ppPGA parecen funcionar como señal de reconocimiento para el sistema de transporte Tat. ii) La región-n del péptido señal original de ppPGA no es suficiente para dirigir eficientemente hacia Tat. iii) La hidrofobicidad del segmento h tiene una contribución importante en la dirección hacia Tat.

III.2 Nuevos sistemas de mutagénesis a nivel de codón

Se han desarrollado varios métodos para acelerar las modificaciones de las enzimas, por mutagénesis enzimática de los genes que las codifican o por amplificación de moldes mutantes. Los métodos enzimáticos están basados principalmente en PCR que introduce nucleótidos erróneos, y/o recombinación *in vivo* (32). Desafortunadamente, un gran número de reemplazamientos de aminoácidos no son representados adecuadamente, dado que requieren cambios en dos o tres nucleótidos del codón blanco.

Gaytán y colaboradores (32) pusieron en práctica la teoría propuesta por Shortle y Sondek (32), donde se hacen reemplazamientos por codones, utilizando una combinación de trinucleótidos fosforamiditos protegidos por Fmoc (Fmoc representa el grupo 9-fluorenilmethoxycarbonyl) y monómeros protegidos por DMTr. (DMTr representa el grupo protector 4,4-dimethoxytrityl). Los codones mutantes son introducidos por incorporación subestequiométrica de trinucleótidos Fmoc a las cadenas de oligonucleótidos crecientes, mientras que los codones silvestres son ensamblados a través de monómeros DMTr; durante la síntesis de oligonucleótidos. El éxito de este método reside en la ortogonalidad de los grupos protectores, mientras DMTr es sensible al ácido y estable al básico, el Fmoc es al contrario. Con este método se elimina la redundancia de codones, así como codones de paro y permite una exploración completa del espacio de secuencia, obteniendo mutaciones simples, dobles, triples o más en una proteína (33).

Se sintetizaron 20 fosforamiditos trinucleótidos Fmoc, en la figura 20 se enlistan estos fosforamiditos trinucleótidos Fmoc y los aminoácidos que codifican.

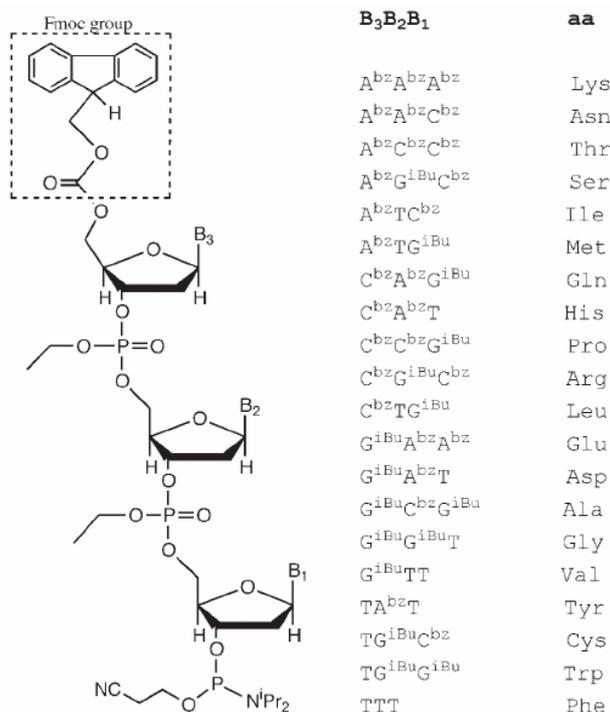


Figura 20. Fosforamiditos trinucleótidos sintetizados. A^{bz} : N⁶-benzoyl adenina, C^{bz} : N⁴-benzoyl citosina; G^{iBu}: N² isobutiril guanina; T: timina (Yáñez et al., 2004).

Una vez sintetizados los fosforamiditos trinucleótidos el siguiente paso es la mutagénesis. Aquí se da una combinación de fosforamiditos trinucleótidos Fmoc y fosforamiditos monómeros de DMTr, los codones mutantes son ensamblados con fosforamiditos trinucleótidos protegidos con Fmoc mientras que los codones silvestres son ensamblados con monómeros protegidos con DMTr. Esto se muestra en la figura 21, donde la esfera inicial representa un oligonucleótido protegido con DMTr que crece en un soporte sólido. La síntesis procede en la dirección 3'-5'. En el primer paso, el grupo DMTr es removido por un tratamiento ácido (H⁺). Una parte del oligo creciente reacciona con una solución diluída de un solo fosforamidito trinucleótido o con una mezcla de fosforamiditos trinucleótidos Fmoc (XXX-O-Fmoc), sin tener capucha, oxidación y destritilación. Las cadenas restantes son saturadas con tres acoplamientos secuenciales ordinarios (W-O-DMTr) para ensamblar el codon silvestre para ser parcialmente reemplazado. Finalmente se da la remoción de los grupos por tratamientos secuenciales ácido y base (B⁻) y se prepara al oligo para un nuevo ciclo de mutagénesis.

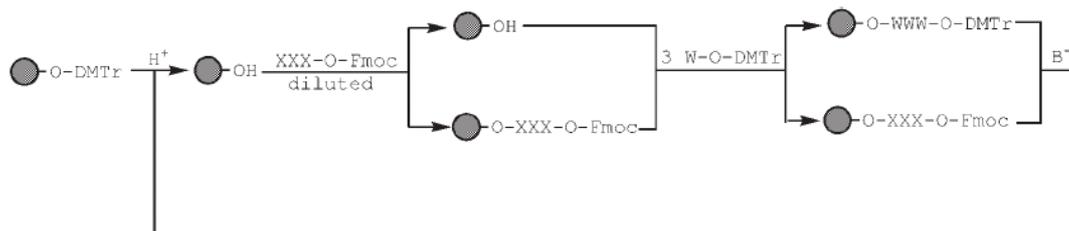


Figura 21. Método que combina Fmoc/DMT para la síntesis liberías de oligonucleótidos (Yáñez et al., 2004).

III.3 Sistema de selección para actividad de PGA

El Dr. Perry Chou (16) tuvo la idea de diseñar un sistema de selección para PGA, basándose en el hecho de que células que expresan *pac* pueden hidrolizar penicilina G para formar los productos: PAA y 6-APA. PAA puede ser asimilado como fuente de carbono, mientras que 6-APA es tóxico para la bacteria. Cualquier aumento en la resistencia a penicilina G es debida a un incremento en la hidrólisis mediada por PAG, la cual debe ser acompañada por un incremento en la resistencia que corresponda al nivel de 6-APA. Así, las cepas que sobreproducen PAG son resistentes a penicilina a altas concentraciones.

Chou y colaboradores (16) utilizaron la cepa *E. coli* HB101, la sometieron a mutagénesis por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y a selección en placas de agar con 6-APA o penicilina G, algunas fueron resistentes a ambos antibióticos y adquirieron un aumento en el nivel de actividad de β -lactamasa. El sistema de selección de mutantes PGA activas es llamado concentración mínima inhibitoria para penicilina G (MIC_{penG}), en el cual los inóculos de las cepas fueron goteados en cajas con LB que contienen varias concentraciones de penicilina G (60-100 $\mu\text{g/ml}$), las cajas son incubadas a 30° C por ~24 horas. El MIC_{penG} fue determinado como la concentración mínima a la cual el crecimiento celular es inhibido.

Osuna y colaboradores (4), utilizando una modificación del sistema de Chou y utilizando la cepa *E. coli* XL1-Blue introdujeron un plásmido que contiene una β -lactamasa, la cual le confiere resistencia a 6-APA. La β -lactamasa específica para 6-APA se obtuvo al hacer una sustitución en la posición 132 de una asparagina por un ácido aspártico, con este cambio la enzima presenta una pobre Km hacia penicilina G, convirtiéndola en una enzima específica para 6-APA. Este gen se subclonó bajo el promotor *trc* en el plasmido pACYC184 y se introdujo en las cepas XL1-Blue y JM101 dando como resultado las cepas pACYCPKGS-9 y JM101pACYCPKGS-9.

IV Objetivos

IV.1 General:

Obtener mutantes en el péptido señal de la Penicilina G acilasa de *Escherichia coli*, que permitan una translocación más eficiente de esta enzima hacia el periplasma y determinar la importancia de algunos aminoácidos para dicho transporte.

IV.2 Particulares:

- Obtener una amplia gama de mutaciones en diferentes posiciones del péptido señal de PGA.
- Reevaluar la novedosa técnica de mutagénesis por codón, diseñada en el laboratorio del Dr. Xavier Soberón por el Dr. Paúl Gaytan.
- Observar diferencias en el transporte de PGA hacia periplasma, el cual es proporcional a la resistencia a penicilina G.
- Encontrar mutantes que muestren un incremento en la exportación hacia periplasma de PGA.
- Identificar, por medio del nivel de exportación observado en las variantes, los aminoácidos que pueden ser importantes para una eficiente translocación hacia periplasma.

V Materiales y Métodos

V.1 Medios de cultivo y soluciones

Medio Luria-Bertani (LB)

NaCl 10 g.

Triptona 10 g.

Extracto de levadura 5 g.

Se afora a un litro con agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza a 121°C por 15-20 min.

Medio sólido (para placas) agregar:

Bactoagar 5 g.

Medio LB bajo en sal

NaCl 5 g.

Triptona 10 g.

Extracto de levadura 5 g.

Se afora a un litro con agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza a 121°C por 15-20 min.

Medio SOC

Triptona 10 g.

Extracto de levadura 2.5 g.

NaCl (1 M) 5 ml.

Glucosa (2 M) 50 µl.

KCl (1 M) 1.25 ml.

Mg SO₄ (1 M) 50 µl.

Se afora a 500 ml. con agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza a 121°C por 15-20 min.

Medio GYT

Glicerol 10 %

Extracto de levadura 0.125 %

Bacto-triptona 0.125 %

Se esteriliza a 121 °C por 15-20 min.

PBS 1X

NaCl 8 g.

KCl 0.2 g.

Na₂HPO₄ 1.44 g.

KH₂HPO₄ 0.24 g.

Se afora a un litro con agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza a 121°C por 15-20 min.

Buffer De Tris Bórato (TBE) 10X
Tris Base 108 g.
Ácido bórico 55 g.
EDTA pH 8 20 ml.
Aforar a un litro con agua bidestilada.

Glicerol 10%
Glicerol 10 ml.
Se afora a 100 ml con agua bidestilada y se esteriliza a 121°C por 15-20 min.

Buffer Tris-Glicina 5X
Tris base 15.1 g.
Glicina 94 g.
SDS 10% 50 ml.
pH 8.3

Buffer de transferencia
Tris base 5.8 g.
Glicina 2.9 g.
SDS 0.37 g.
Metanol 200 ml.

Kanamicina 25 mg/ml.
Kanamicina 0.25 g.
Agua bidestilada 10 ml.
Se esteriliza por filtración y se almacena a -20 °C.

Tetraciclina 10 mg/ml.
Tetraciclina 0.1 g.
Agua bidestilada 10 ml.
Se esteriliza por filtración y se almacena a -20 °C.

Cloranfenicol 40 mg/ml
Cloranfenicol 0.04 g.
Etanol absoluto 1 ml
Agitar hasta disolverse y se almacena a -20 °C.

Penicilina G 200 mg/ml
Penicilina G 0.2 g
PBS 1X 1 ml.
Agitar hasta disolverse y se almacena a -20 °C.

Penicilina G 50 mg/ml.
Penicilina G 0.05 g
PBS 1X 1 ml.
Agitar hasta disolverse y se almacena a -20 °C.

6 APA 2 mg/ml
Ácido 6 aminopenicilánico 0.01 g
PBS 1X 5 ml
Agitar hasta disolverse y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Agarosa 1%
Se disuelve por calentar 1 g. de agarosa (grado analítico y electroforético) en 100 ml. de TBE 1X.

Agarosa 2%
Se disuelve por calentar 2 g. de agarosa (grado analítico y electroforético) en 100 ml. de TBE 1X.

V.2 Procedimientos generales

V.2.1 Purificación de plásmidos

Se forma un paquete celular centrifugando el cultivo durante 20 minutos a 3,500 rpm y se continua la purificación utilizando el equipo *High Pure Plasmid Isolation Kit* para minipreparaciones de Roche (*Boehringer Mannheim*, 1754785). Por cada 5 ml de cultivo bacteriano se resuspende el paquete celular en 250 μl . del amortiguador para suspensión (solución I: Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM y Rnasa a pH 8); la lisis celular se realiza adicionando 250 μl de la solución para lisado (solución II: Na OH 0.2 M y SDS 1%) para luego neutralizar con 350 μl del amortiguador de unión(solución III: hidrocloreuro de guanidino 4 M y acetato de potasio 0.5 M a pH 4.2); se centrifuga durante 10 minutos a máxima velocidad (14,000 rpm) y el sobrenadante se transfiere a una columna de filtrado para centrifugarse durante un minuto a 13,000 rpm. Se decanta el sobrenadante y se lava la columna con 500 μl de una solución de lavado (solución IV: hidrocloreuro de guanidino 5 M y Tris-HCl 20 mM a pH 6.6) centrifugando durante un minuto a 13,000 rpm, nuevamente se descanta el sobrenadante y se realiza un lavado con 700 μl de otra solución de lavado (solución V: NaCl 20 mM y Tris-HCl 2 mM a pH 7.5) centrifugando igual que en el primer lavado; se elimina el sobrenadante y se vuelve a centrifugar de 30 segundos a un minuto, para quitar el exceso de amortiguadores. Ya seca la columna se eluye el ADN adicionando 100 μl de agua bidestilada y centrifugando durante un minuto a 13,000 rpm.

V.2.2 Purificación de productos de PCR

Se utiliza el equipo *High Pure PCR Product Kit* de Roche (Boehringer Mannheim, 1732676). Por cada 100 µl de reacción se adicionan 500 µl del amortiguador de unión (solución VI: tiocianato de guanidino 3 M, Tris-HCl 10 mM y etanol 5% a pH 6.6), la mezcla se transfiere a una columna de filtrado para centrifugarse durante un minuto a 13,000 rpm. Se descanta el sobrenadante y se lava la columna con 500 µl de la solución IV se centrifuga por un minuto a 13,000 rpm, nuevamente se descanta el sobrenadante y se realiza un segundo lavado con 700 µl de la solución V, centrifugando igual que en el primer lavado, se elimina el sobrenadante y se vuelve a centrifugar para quitar el exceso de amortiguadores. Ya seca la columna, se eluye el ADN adicionando 50-100 µl de agua bidestilada y centrifugando también durante un minuto.

V.2.3 Extracciones por electroforesis en gel de agarosa

Utilizando una lámpara de luz UV con longitud de onda larga se visualiza la banda de ADN de interés teñida con bromuro de etidio y se corta del gel con una navaja limpia. El trozo de gel se pesa en un tubo sin color, por cada 100 mg. de gel se adicionan 300 µl del amortiguador para solubilización (solución VII: *Merck Buffer QG*, con indicador de pH, QUIAGEN) y se incuba a 37 °C hasta que se disuelva el gel. La mezcla gel-amortiguador debe estar amarilla, lo cual indica que el pH es ≤ 7.5 . Si el color de la mezcla es anaranjado o violeta se debe agregar acetato de sodio 3 M a pH 5 hasta que cambie a color amarillo. Una vez disuelto el gel, se transfiere el solubilizado a una columna de filtrado para centrifugarse durante un minuto a 13,000 rpm. Se descanta el sobrenadante y se lava la columna con 500 µl de la solución IV se centrifuga por un minuto a 13,000 rpm, nuevamente se descanta el sobrenadante y se realiza un segundo lavado con 700 µl de la solución V, centrifugando igual que en el primer lavado, se elimina el sobrenadante y se vuelve a centrifugar para quitar el exceso de amortiguadores. Ya seca la columna, se eluye el ADN adicionando 50-100 µl de agua bidestilada y centrifugando también por un minuto a 13, 000 rpm.

V.2.4 Preparación de células electrocompetentes

Se toma una colonia del medio sólido y se pone a crecer en 10 ml de medio LB líquido toda la noche (over night, ON) con el antibiótico adecuado. Estos 10 ml se pasan a un matraz con un litro de medio LB bajo en sal con los antibióticos adecuados y se deja crecer hasta que tenga una densidad óptica de 0.6 OD₆₀₀. El medio de cultivo se centrifuga 15 minutos a 5,000 rpm a 4°C y se desecha el sobrenadante. Entonces se resuspende en 1 volumen de glicerol 10% frío, se centrifuga 15 minutos a 5,000 rpm a 4°C y se desecha el sobrenadante, este paso se repite para ½ y ¼ de volumen y para 1/8 de volumen el tiempo de centrifugación es de 9 minutos. Finalmente se resuspende en 1-2 ml de GYT, se pasan a varios tubos de 0.5 ml, los cuales se colocan en hielo seco durante unos minutos y después se guardan a -70°C.

V.2.5 Electrotransformación

La electroporación o electrotransformación es un proceso físico que permeabiliza temporalmente las membranas celulares por medio de un pulso eléctrico; la introducción de ADN a una bacteria por este método provee una eficiencia mayor que por los medios químicos: una mezcla de ADN y células se someten a un campo eléctrico intenso de onda en decaimiento exponencial.

El plásmido o la ligación a electroporar se mezclan como ya mencionamos con las células electrocompetentes adecuadas y con glicerol 10% en una celda de electroporación de 1 mm (*Biorad*), posteriormente se les aplica un pulso de 1.6 a 1.8 KV en un electroporador *Biorad Gene Pulser*. Después del pulso las células se recuperan en 1 ml de medio líquido LB o SOC y se incuban por una hora a 30°C, para posteriormente ser sembradas en un medio LB sólido con los antibióticos adecuados. Todo el procedimiento se debe realizar bajo condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar y con todo el material estéril.

V.2.6 Secuenciación

Para la secuenciación se purificó el plásmido con la construcción a determinar con el estuche *High Pure Plasmid Isolation Kit* para minipreparaciones de Roche (Boehringer Mannheim, 1754785). El volumen final de la reacción de la secuencia fue de 16 μ l, donde se puso de 500-700 ng de plásmido, 10 pmol del oligonucleótido adecuado y el resto de agua bidestilada. Todas las secuencias se determinaron en el secuenciador automático Perkin-Elmer 377-18, el cual detecta la fluorescencia de los cuatro diferentes fluoróforos usados como terminadores de la reacción para identificar las reacciones de extensión de las bases nucleóticas A, G, C y T. Cada fluoróforo se excita a diferentes longitudes de onda cuando se exponen al rayo láser y de esta forma las cuatro emisiones pueden ser detectadas y distinguidas en un solo carril de gel.

V.2.7 Digestiones

Se toman de 100 ng a 500 ng del ADN que se desea digerir; se agrega 1 μ l por cada 10 μ l del volumen final del buffer adecuado para la digestión con las enzimas deseadas; si la enzima lo requiere se agrega también BSA (0.1 μ l por cada 10 μ l del volumen final); se agregan 1 unidad de las enzimas deseadas y se llevan a un volumen final con agua. Se deja digiriendo toda la noche (ON) a 37°C.

V.2.8 Limpieza de digestiones

La digestión se corre en un gel de agarosa al 1% o 2% según el tamaño del fragmento deseado, se corta la banda correspondiente a dicho fragmento y se extrae el ADN siguiendo el protocolo para extracciones por electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente se cuantifica la concentración de ADN extraído.

V.2.9 Ligaciones

Para la ligación se ponen en una proporción 1-3 o 1-5 el vector y el inserto, se agrega el buffer (1µl por cada 10 µl del volumen final) para la ligasa, una unidad de T4 ADN ligasa y agua. LA reacción se deja a 16° C ON. La ligación se concentra con butanol, adicionando 500 µl de butanol por cada 100 µl de reacción de ligación, centrifugando 10 minutos a 14,000 rpm para luego decantar el sobrenadante, secar la pastilla en Savant por otros 10 minutos y resuspenderla en 10 µl de agua bidestilada.

V.3 Los oligonucleótidos

En la tabla 1 se listan los oligonucleótidos (oligos) utilizados para las PCRs, la secuenciación y las polimerizaciones de ADN con el fragmento Klenow, que es la subunidad de la ADN polimerasa con actividades de polimerización y corrección.

Todos los oligos fueron sintetizados en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología –IBt (www.ibt.inam.mx), utilizando el método de fosfito-triéster en fase sólida, en el que la cadena creciente de ADN se mantiene “anclada” a un soporte sólido depositado en una columna delimitada por dos filtros e insoluble en los reactivos que fluyen a través de la misma.

Oligo	Longitud (pb)	Secuencia
30-TAILECO	30	5' CCG TGG ATC GTG GTT GAC GAA AGG GCC TCG 3'
45-NDEBLA	45	5' ACG GAA ATG TTG AAT AGA CAT ATG CCT CCT TTT TCA ATA TTA TTG 3'
34-NDEBLA	34	5' AAG GAG GCA TAT GTC TAT TCA ACA TTT CCG TGT C 3'
ENDXHOHIS	42	5' CCG GCT CGA GTC ATT AGT GGT GGT GGT GGT GGT GCC AAT GCT 3'
SECPROBLA	20	5' CGG GGA AAT GTG CGC GGA AC 3'

Spal	57	5' TCG TGG CAT ATG AAT CGC AAT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT GCT TCC CTG ATG 3'
20-SphI	20	5' AGG TGC CAT GTA TCA TTG GC 3'
27-SacI	27	5' CCT TAT CTC ACT TGA GCT CTG CTC AGC 3'
21-NCOI	21	5' CAG AGA AGC GGT TTG CCA TGG 3'
PSNH	61	5' AGG AGG CAT ATG AAA AAT CGC AAT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT GCT TCC CTG ATG 3'
59-SacI	59	5' AT CTC ACT TGA GCT CTG CTC AGC CAG TGC AGG TAA GCT CCA ATA ATA CAT CAG GGA AGC 3'
PSCOOH	63	5' TGA CGA CTG CTC AGC CAG TGC AGG TAA GCT CCA ATA ATA CAT CAG GGA AGC AGT AAC ACA GTT 3'
24-PSCOOH	24	5' TAT CTC ACT TGA GCT CTG CTC AGC 3'
48-NdeI	48	5' AGG AGG CAT ATG AAA CGC AAT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT 3'
19-PCRPSNH	19	5' GGG CGG TAG GCG GCA TAT G 3'

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para las PCRs, la polimerización de ADN (Klenow) y las secuenciaciones.

V.4 Las enzimas

La tabla 2 se enlistan las enzimas utilizadas en el proyecto

Enzima	Tipo / Uso	Fuente	Condiciones de uso	Descripción
<i>AatII</i>	endonucleasa / restricción	comercial (NE BioLabs)	*NEBuffer 4 1X: Acetato de potasio 50 mM Tris-acetato 20 mM Acetato de magnesio 10 mM DDT 1 mM *pH 7.9 *Incubar a 37°C	5' G A C G T / C 3' C / T G C A G

<i>XhoI</i>	endonucleasa / restricción	comercial (NE BioLabs)	*NEBuffer 2 1x: NaCl 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM DDT 1 mM pH 7.9 *BSA 100 mg/ml *Incubar a 37°C	5' C / T C G A G 3' G A G C T / C
<i>NdeI</i>	endonucleasa / restricción	comercial (NE BioLabs)	*NEBuffer 4 1X: Acetato de potasio 50 mM Tris-acetato 20 mM Acetato de magnesio 10 mM DDT 1 mM *pH 7.9 *Incubar a 37°C	5' C A / T A T G 3' G T A T / A C
<i>SphI</i>	endonucleasa / restricción	comercial (NE BioLabs)	*NEBuffer 4 1X: Acetato de potasio 50 mM Tris-acetato 20 mM Acetato de magnesio 10 mM Ditiotreitol 1 mM *pH 7.9 *Incubar a 37°C	5' G C A T G / C 3' C / G T A C G
<i>NcoI</i>	endonucleasa / restricción	comercial (NE BioLabs)	*NEBuffer 4 1X: Acetato de potasio 50 mM Tris-acetato 20 mM Acetato de magnesio 10 mM DDT 1 mM *pH 7.9 *Incubar a 37°C	5' C / C A T G G 3' G G T A C / C

<i>SacI</i>	endonucleasa / restricción	comercial (NE BioLabs)	*NEBuffer 1 1X: Bis Tris Propano-HCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM DDT 1 mM *pH 7 *BSA 100µg/ml *Incubar a 37°C	5´ G A G C T / C 3´ C / . T C G A G
<i>ScaI</i>	endonucleasa/ restricción	comercial (NE BioLabs)	*NEBuffer 3 1X: NaCl 100 mM Tris-HCl 50 mM Mg Cl ₂ 10 mM DDT 1 mM *pH 7.9 *incubar a 37°C	5´ A G T / A C T 3´ T C A / T G A
<i>BglII</i>	endonucleasa/ restricción	comercial (NE BioLabs)	*NEBuffer 4 1X: Acetato de potasio 50 mM Tris-acetato 20 mM Acetato de magnesio 10 mM DDT 1 mM *pH 7.9 *Incubar a 37°C	5´ A / G A T C T 3´ T C T A G / A
<i>T4 Ligasa</i>	ADN ligasa / ligaciones	comercial (NE BioLabs)	*Buffer 1x : Tris-HCl 50 mM MgCl ₂ 10 mM DDT 10 mM ATP 1 mM BSA 25 µg/ml *pH 7.5 *Incubar a 16°C	* Cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5´- fosfato y 3´-hidroxilo de ADN dúplex o RNA

<i>Taq Polimerasa</i>	ADN polimerasa / reacciones de PCR	obtenida por purificación (IBt)	*Perkin Elmer Buffer II para PCR 1x: Tris-HCl 10 mM KCl 50 mM *pH 8.3 *MgCl ₂ 1.5 mM	*Se probó que 3 µl equivalen a 2.5 U de la <i>Ampli Taq Polymerase</i> (Perkin Elmer) al dar el mismo rendimiento de producto utilizando iguales condiciones de PCR.
<i>Klenow</i>	Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I/ polimerización y corrección	comercial (NE BioLabs)	NEBuffer 2 1X: NaCl 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM DDT 1 mM *pH 7.9	

Tabla 2. Lista de enzimas empleadas en el proyecto.

V.5 Las cepas

E.coli XL1-Blue : cepa de alta eficiencia de transformación utilizada para recuperar las mutantes y realizar las pruebas de actividad para penicilina G acilasa

E.coli XL1-Blue PACYC PKGS #9 : cepa de selección, en la cual se realizaron también los ensayos de concentración mínima inhibitoria a penicilina G.
(Flores et al 2004)

V.6 Preparación del vector

Las construcciones se hicieron en el vector pT4BLA que porta un gen de resistencia a kanamicina (Km^R) y el promotor relativamente débil del gene que codifica para la enzima β -lactamasa ($pBlac$) como se muestra en la figura 24a.

V.6.1 Cambio de *NcoI* por *NdeI*

El **primer** paso fue cambiar el sitio de restricción *NcoI* por un sitio *NdeI* en el vector pT4BLA (fig. 24b), por medio de tres PCR's utilizando los siguientes pares de oligos: Primera PCR: 30-TAILECO y 45-NDEBLA; Segunda PCR 34-NDEBLA y ENDXHOHIS; y tercera PCR 30 TAILECO y ENDXHOHIS. En la primera y en la segunda PCR se utiliza al vector pT4BLA como molde, mientras que para la tercera PCR se usa como molde el producto de las PCR's anteriores.

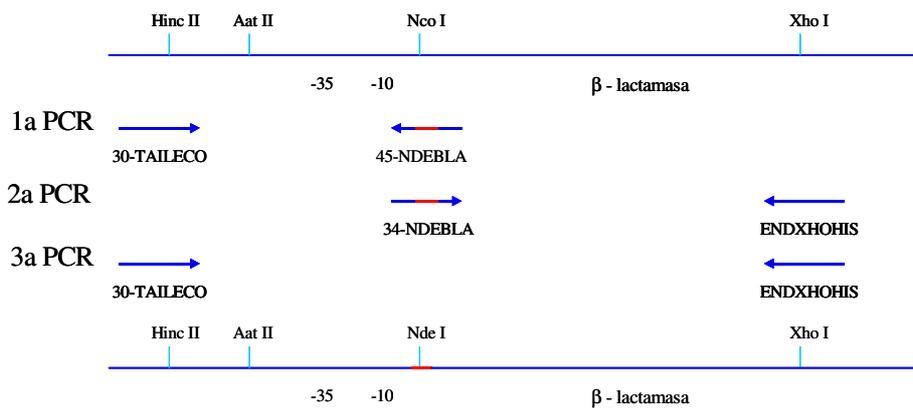


Figura 22. Estrategia para cambiar el sitio de restricción *NcoI* a un sitio *NdeI*. Las flechas indican los oligos, en rojo se indica la mutación.

Las PCR's (*Polimerase Chain Reaction*) se realizaron en una máquina Perkin Elmer, modelo Gene Amp PCR system 9700.

ADN 100 ng

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

Oligo 5'-3' 20 pmol

Oligo 3'-5' 20 pmol

MgCl₂ 1.5 mM

Taq polimerasa 2.5 U

H₂O bidestilada para completar 100 μ l de reacción final.

En la figura 23 se muestra el programa en el termociclador utilizado para las PCRs.

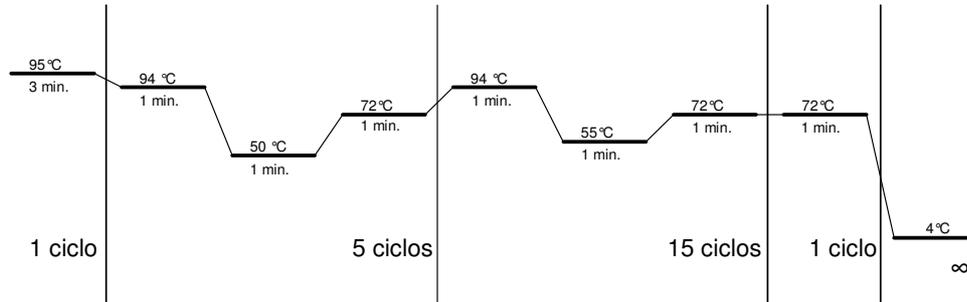


Figura 23. Programa del termociclador para amplificar las PCRs.

La digestión

3µg pT4BLA	5µg producto de 3 ^a PCR
<i>AatII/XhoI</i>	<i>AatII/XhoI</i>
BSA	BSA

Los fragmentos obtenidos fueron purificados, el vector mediante extracción por electroforesis en gel de agarosa al 1% y la digestión del producto de PCR por columna. La concentración de ADN se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa.

La reacción de ligación se lleva a cabo por 1 hora a temperatura ambiente:

100 ng pT4BLA	300 ng producto de 3 ^a PCR
---------------	---------------------------------------

De los 10 µl resultantes de la ligación se tomaron 3 µl para electroporar 5 µl de células XL1-Blue electrocompetentes más 32 µl de glicerol al 10% con un pulso de 1.7 KV. Después de la recuperación, se sembraron en cajas de LB sólido con 25 µg/ml de kanamicina a 37°C ON. Posteriormente de las colonias obtenidas se tomaron 5 colonias al azar que fueron crecidas en 5 ml. de medio LB líquido con kanamicina 25 µg/ml ON a 37°C. A estos inóculos se les purificó el plásmido utilizando el kit de Boehringer (High Pure TM Plasmid Isolation Kit), y se verificó que tuvieran el inserto por medio de un análisis de restricción. A este nuevo vector le denominamos pT4BLA/Nde⁺.

V.6.2 Reemplazamiento de β -lactamasa por *pac*

El **segundo** paso fue insertar el gene *pac* en el lugar de la enzima β -lactamasa en el vector pT4BLA/Nde⁺ (fig. 24c)

La digestión

5 μ g pT4BLA/Nde ⁺	5 μ g pACWT
<i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	<i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>

Ambas digestiones se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se cortaron las bandas correspondientes al vector pT4BLA/Nde⁺ (sin el gene de β -lactamasa) y al gene *pac*, respectivamente.

Se ligan por 1 hora a temperatura ambiente:

100 ng pT4BLA/Nde ⁺	300 ng gen <i>pac</i>
--------------------------------	-----------------------

Se utilizaron 3 de los 10 μ l de ligación para electroporar 10 μ l de células electrocompetentes XL1-Blue. Después de la recuperación se sembraron en medio LB sólido con kanamicina 25 μ g/ml y se incubaron ON a 30°C. De esas cajas se tomaron 4 colonias para purificar su plásmido con High Pure TM Plasmid Isolation Kit. Los posibles vectores pT4PAC puros, se cuantificaron por electroforesis en gel de agarosa 1% y se corroboraron por análisis de restricción.

Se tomaron 2 vectores (pT4PAC# 3 y 4) que cumplieron con el patrón de restricción y se mandaron secuenciar aproximadamente 500 ng de cada vector, con 10 pmol de oligo SECPROBLA en un volumen total de 16 μ l a la Unidad de Secuencia del Instituto de Biotecnología –IBt. Y encontramos los mismos errores en las secuencias:

WT	ATG-AAA-AAT- AGA -AAT-CGT-ATG-ATC-GTG-AAC-TGT
PT4PAC#3y4	ATG AAA AAT CGC -AAT-CGT-ATG-ATC-GTG-AAC-TGT
WT	GTT-ACT-GCT- TCC -CTG-ATG-TAT-TAT-TGG-AGC-TTA
PT4PAC#3y4	GTT-ACT-GC- - - -C-CTG-ATG-TAT-TAT-TGG-AGC-TTA

Los cambios se muestran en rojo, la mutación de AGA por CGC es una mutación silenciosa, ya que ambos codones codifican para arginina, aunque la tasa preferencial de codón es mayor para el segundo codón en *E. coli XL1-Blue*. La delección de los 3 nucleótidos da lugar la pérdida de un aminoácido (serina) porque el codón GCC codifica para alanina al igual que GCT.

V.6.3 Corrección de *pac*

Así el **tercer** paso fue corregir la delección de los tres nucleótidos por medio de PCR (fig 24d), empleando los oligos 20-SphI y Spal, con el vector pT4PAC#4 como molde y bajo las condiciones ya mencionadas. La PCR se purificó por columna, siguiendo el protocolo para purificación para PCRs de Boehringer (High Pure PCR Kit).

Se digirió ON

500 ng pT4PAC#4	5000 ng de PCR
<i>SphI</i>	<i>SphI</i>

Y después se añadió

<i>NdeI</i> ⁺	<i>NdeI</i>
--------------------------	-------------

Y se dejó por 5 horas

Los productos de estas digestiones se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 y 2% para el vector y el producto de PCR, respectivamente.

La ligación se dejó por 1 hora a temperatura ambiente

100 ng pT4PAC#4	200 ng de PCR
-----------------	---------------

Tomamos 3 µl de la ligación para electroporar 5 µl de células XL1-Blue electrocompetentes, más 42 µl de glicerol 10. Después fueron sembradas en 3 cajas (a, b, c) con medio LB sólido más 25 µg/ml de kanamicina y se dejaron crecer a 30°C ON. De las tres cajas tomamos 10 colonias, se pusieron inóculos y les purificamos el plásmido bajo el protocolo de High Pure TM Plasmids Isolation Kit.

Mandamos a la Unidad de Secuencia del Instituto de Biotecnología –IBt, aproximadamente 500 ng de los 10 vectores pT4PAC#4 (a1, a2, a3, b1, b2, b3,b4, c1, c2, c3) con 10 pmol del oligo SECPROBLA y agua, en un volumen final de 16 µl. De estas 10 secuencias sólo obtuvimos dos (pT4PAC#4b1 y 4b2) que tienen la secuencia corregida, a los cuales nos referiremos como pT4PAC (WT).

pT4PACWT ATG-AAA-AAT-CGC-AAT-CGT-ATG-ATC-GTG-AAC-TGT-GTT-ACT-GCT
 TCC-CTG-ATG-TAT-TAT-TGG-AGC-TTA

V.6.4 Cambio de vector

Un **cuarto** paso fue cambiar el vector por un vector pT4BLA que difiere del pT4BLA/Nde⁺ en la delección del sitio de restricción *SacI* por medio de una mutación silenciosa, al cual nos referiremos como pT4BLA/*Sac*⁻ y fue construido por el Dr. Osuna (fig 24 e).

Se digirieron

4000 ng pT4BLA/ <i>Sac</i> ⁻	4000 ng pT4PAC
<i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>	<i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>

Ambas digestiones fueron purificadas por electroforesis en gel de agarosa al 1%, de la primera digestión se cortó la banda correspondiente al vector y de la segunda la correspondiente al gene *pac*.

Para la ligación se dejaron por 4 horas a temperatura ambiente

100 ng pT4BLA/ <i>Sac</i> ⁻	300 ng pT4PAC
--	---------------

Del resultado de la ligación se tomaron 3 µl para electroporar 5 µl de células XL1-Blue electrocompetentes. Una vez recuperadas las células, sembramos en cajas con medio LB sólido con 25 µg/ml de kanamicina y las dejamos crecer ON a 30°C.

De las colonias crecidas en las cajas tomamos 5 y las pusimos a crecer en inóculos de 5 ml. con medio LB líquido con 25µg/ml de kanamicina, ON a 30 °C. Para obtener los 5 respectivos plásmidos utilizando el protocolo de High Pure TM Plasmids Isolation Kit. Se cuantificó el ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1% y les hicimos un análisis de restricción. Todos cumplieron con el patrón de restricción y los etiquetamos como pT4PAC/Sac⁻.

V.6.5 Introducción del sitio de restricción *SacI*

El **quinto** y último paso fue la introducción de un sitio único de restricción *SacI* dentro del gene *pac* lo mas cercano al péptido señal posible (fig 24f), por medio de dos PCRs.

La primera PCR utilizando como molde el vector pT4PAC/Sac⁻ y los oligos Spal y 27-SacI. El producto de esta primera PCR fue purificado por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

La segunda PCR fue una extensión hasta *NcoI*, utilizando el mismo molde y como oligos a 21-NcoI y el producto purificado de la primera PCR, el producto de esta 2ª PCR se purificó también por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

El producto puro de la 2ª PCR fue digerido

4000 ng pBLA/Sac ⁻	5000 ng 2ª PCR
<i>NdeI</i> y <i>XcoI</i>	<i>NdeI</i> y <i>XcoI</i>

Se purificó y cuantificó por medio de electroforesis en gel al 1% y 2, para el vector pT4BLA/Sac⁻ y el producto de la 2ª PCR, respectivamente.

La ligación se realizó con

100 ng pBLA/Sac ⁻	300 ng 2ª PCR
------------------------------	---------------

De está ligación se tomaron 3 µl para electroporar 10 µl de células electrocompetentes de XL1-Blue más 40 µl de glicerol 10%.

Después de la hora de recuperación se sembró en cajas de LB sólido más 25 µg/ml de kanamicina, ON a 30°C. De estas cajas se tomaron 9 colonias al azar y se crecieron en 5 ml de LB líquido más 25 µg/ml de kanamicina, se dejaron crecer ON a 30°C y se les purificó el plásmido con High Pure TM Plasmid Isolation Kit. Una vez puro se les cuantificó el ADN y se les hizo un análisis de restricción. A los 2 plásmidos que cumplieron con el patrón de restricción les denominamos pT4PAC/Sac

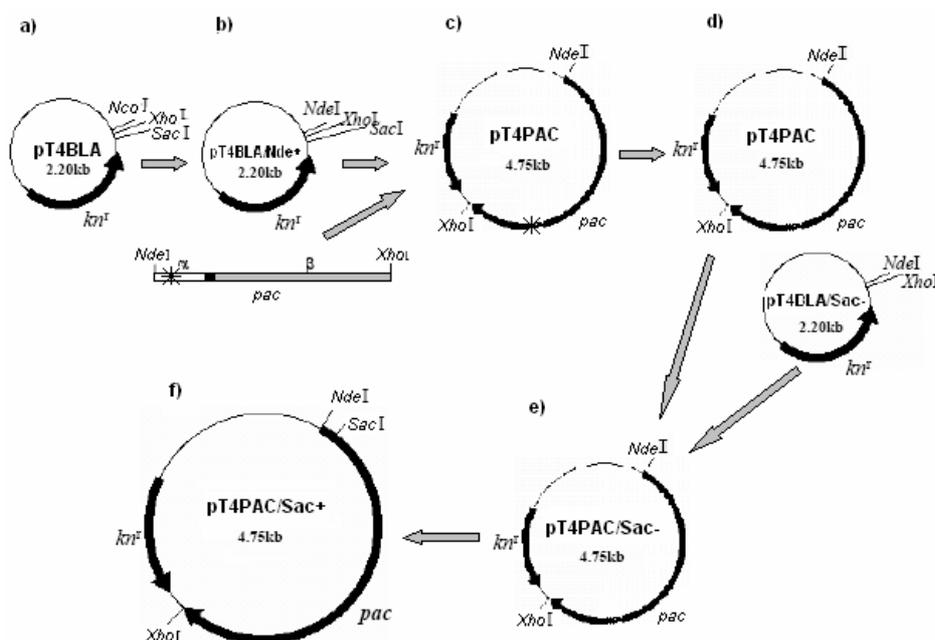
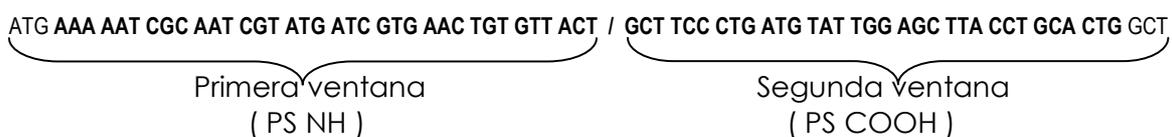


Figura 24. Construcción del vector. El vector deriva del plásmido pT4BLA (a) al que se le cambió el sitio *NcoI* por *NdeI* (b). En este vector se clonó el gen de PGA (c), pero portaba mutaciones mostradas como un asterisco que fueron corregidas por PCR (d). Se volvió a clonar *NdeI/XhoI* en un vector pT4BLA/Sac⁻ (e) y se diseñó un sitio *SacI* al inicio del gen *pac* (f) El plásmido final pT4PAC/Sac⁺ contiene un nuevo sitio de restricción *SacI*, que se encuentra al inicio de la región codifica para el sitio de inicio de PGA

V.7 La mutagénesis al azar

La mutagénesis por codón de la región que codifica al péptido señal de la penicilina G acilasa fue dividida en dos segmentos o ventanas:



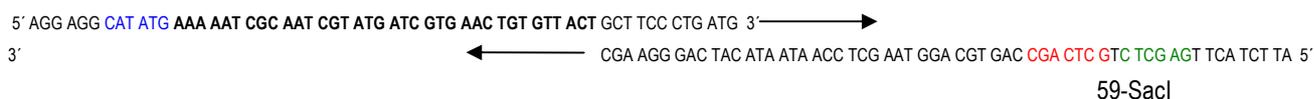
Se sintetizaron químicamente como lo describen Gaytán y colaboradores (32) seis fosforamiditos trinucleótidos protegidos con Fmoc cuyas secuencias son: ATA, CCA, CGG, GCA, GCT Y TTC. Estos trinucleótidos y los 20 compuestos previamente descritos (32) fueron utilizados para preparar los pools mutagénicos correspondientes a los codones y anti-codones. Cada mezcla fue usada para modificar los segmentos de ADN de la cadena codificante o la no codificante, respectivamente.

V.7.1 La reacciones de polimerización con el fragmento Klenow

Para lograr lamutagénesis al azar se diseñaron los oligos:

De la 1ª Ventana (PS NH)

PSNH



De la 2ª Ventana (PS COOH)

PSCOOH



Los nucleótidos en azul indican sitios de restricción para *NdeI*, en rojo para *BfpI* y en verde para *SacI*; en negritas aquellos codones que pueden ser mutados

1ª Ventana (PSNH)

Se hizo una mezcla con:

~100 pmol del oligo mutagénizado PSNH	(1 µl)
~100 pmol del oligo 59-Sac I	(27 µl)
Buffer para Klenow	(5 µl)
dNTP's	(10 µl)
Agua bidestilada	(4 µl)

Esta mezcla permaneció por 15 minutos a 75°C y dejamos bajar gradualmente la temperatura hasta la temperatura ambiente (25°C), enseguida lo pasamos a hielo por 15 minutos, transcurridos los 15 minutos agregamos 2.5 U de Klenow y la dejamos por hora y media a 37°C. Para inactivar a la enzima calentamos por 15 minutos a 70°C y la guardamos a 4°C.

2ª Ventana

Se hizo una segunda mezcla con:

~100 pmol del oligo mutagénizado PSCOOH	(21 µl)
~100 pmol del oligo 48-Nde	(5 µl)
Buffer para Klenow	(5 µl)
dNTP's	(10 µl)
Agua bidestilada	(6 µl)

Se realizó el mismo procedimiento con esta ventana que con la anterior.

PCR de la Klenow de la 2ª ventana

Debido a un cambio de estrategia (porque no logramos clonar con Nde I/Blp I, como habíamos pensado en un principio), tuvimos que extender la klenow de la segunda ventana e insertar el sitio de restricción *SacI* (una mutación silenciosa) por medio de PCR.

Para la PCR se utilizaron como oligos: 48-Ndel y 24-PSCOOH, este último es el que introduce el sitio *SacI* (mutación que se muestra en rojo) y hace la extensión. 48-Nde. Como molde el producto de la Klenow (de la segunda ventana), bajo las condiciones para PCR previamente mencionadas. El producto de esta PCR se purificó y se cuantificó por electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

Oligonucleótidos:

24-PSCOOH 5' TAT CTC ACT TGA GCT CTG CTC AGC 3'

48-Ndel 5' AGG AGG CAT ATG AAA CGC AAT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT 3'

Molde:

El producto de la polimerización con el fragmento Klenow

24-PS000H
 5' TAT CTC ACT TGA CGT CTG CTC AGC 3'
 5' TGA C GA CTG CTC AGC C AGT GC ACC TAA GCT CCA ATA ATA C AT C AG GGA AGC AGT AAC ACA GTT C AC GAT C AT ACG ATT GCG ATT TTT CAT ATG 3'
 3' ACT GCT GAC GAG TCG GTC AC GTGG ATT CGA GGT TAT TAT GTA GTC CCT TC GTCA TTG TGT CAA GTG CTA GTA TGC TAA CGC TAA AAA GTATAC 5'
 3' TC ATTG TGT C AA GTG CTA GTA TGC TAA CGC TAA AAA GTATAC GGA GGA 5'
 48-NdeI

Secuencias de los oligos y el molde para la PCR, en rojo se muestra el sitio de restricción *B_lpI*, en café el cambio que se introduce para dar lugar al sitio *SacI* (GCT en lugar de CGA) y en verde el sitio de restricción *SacI*.

V.8 La clonación

V.8.1 Las digestiones

El vector

Se digirieron

700 ng pT4PAC/ <i>Sac</i> ⁺
<i>NdeI/SacI</i>
<i>BSA</i>

Esta digestión se purificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Los insertos:

Toda la Klenow de la 1 ^a ventana	1000 ng PCR de la Klenow de la 2 ^a ventana
<i>NdeI/SacI</i>	<i>NdeI/SacI</i>
<i>BSA</i>	<i>BSA</i>

Las digestiones se purificaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%

V.8.2 Las ligaciones

A) Para la 1^a ventana

1 µg pT4PAC/ <i>Sac</i> ⁺	500 ng Klenow de la 1 ^a ventana
--------------------------------------	--

B) Para la 2^a ventana

1 µg pT4PAC/ <i>Sac</i> ⁺	400 ng PCR de la Klenow de la 2 ^a ventana
--------------------------------------	--

Las ligaciones se dejaron toda la noche a 16°C, se concentraron con butanol y se resuspendieron con 20 µl de agua bidestilada. De cada ligación se tomaron 5 µl para electroporar 80 µl de células XL1-Blue electrocompetentes. Lo cual fue seguido por la recuperación de una hora a 37 °C, en 1 ml de medio SOC complementado con 15 µl de glucosa 20 %. Este inóculo se paso a otro de 20 ml de medio LB liquido con 25 µg/ml de Kanamicina, se dejo crecer ON a 37 °C para purificar los plásmidos y obtener dos grupos de mutantes (uno de cada ventana).

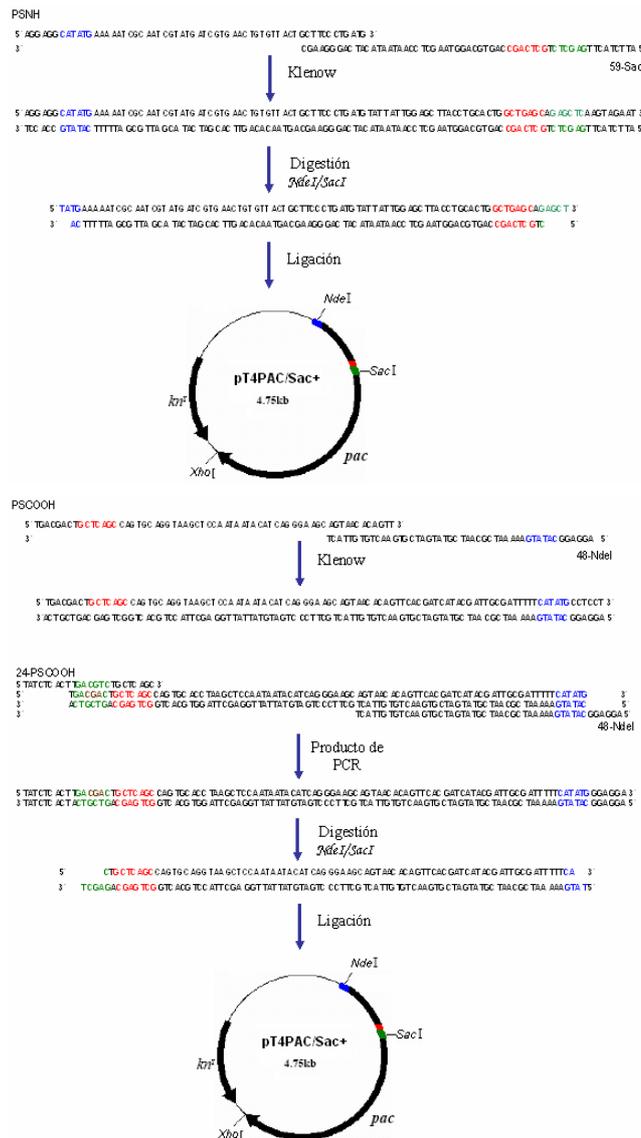


Figura 25. Construcción de las librerías o grupos de mutantes. **A)** obtención de la librería NH y **B)** obtención de la librería COOH. El sitio de restricción *NdeI* se muestra en azul, el sitio *SacI* en verde y el sitio *B_hP* en rojo. Se muestran los pasos de la polimerización con el fragmento Klenow, una PCR extra en el caso de la librería COOH, la digestión con las enzimas *NdeI/SacI* y la clonación en el vector pT4PAC/Sac⁺.

V.9 Selección de colonias mutantes

Se hicieron por separado dos electroporaciones con 5 μ l de cada grupo de mutantes (1^a y 2^a ventana) para electroporar 10 μ l de células XL1-Blue PACYC PKGS-9.

V.9.1 Variantes aisladas al azar o sin selección

Se sembraron en cajas con medio LB sólido adicionando solamente los antibióticos Kanamicina (25 μ g/ml.) y cloranfenicol (20 μ g/ ml.).

De estas cajas se tomaron 5 colonias al azar de la 1^a ventana (NH) y otras 5 colonias al azar de la 2^a ventana (COOH), cada colonia se puso a crecer ON a 30 °C, en un inóculo de 5 ml de medio LB líquido más los respectivos antibióticos (Kanamicina [25 μ g/ml] y cloramfenicol [20 μ g/ ml]). Se les purificó el plásmido (con *High Pure Plasmid Isolation Kit*), y se mandaron a secuenciar estas 10 colonias sin algún tipo de selección con el oligo 21-Ncol

V.9.2 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC_{penG})

De estas mismas cajas se seleccionaron 29 colonias de cada ventana (1^a ventana NH y 2^a ventana COOH) y se pusieron a crecer ON a 30 °C en 1 ml de LB líquido más los respectivos antibióticos (Kanamicina [25 μ g/ml] y cloramfenicol [20 μ g/ ml]). Una vez obtenidos los cultivos, se hicieron diluciones 1:100, 1:1000 y 1:100000 con medio LB líquido estéril y se sembraron gotas de ~10 μ l en cajas previamente preparadas con LB sólido, los antibióticos Kanamicina (25 μ g/ml) y cloranfenicol (20 μ g/ ml) y diferentes dosis de penicilina G (60, 70, 80, 90 y 100 μ g/ml), estas cajas se incubaron a 30 °C según el ensayo, por el tiempo necesario para ver las colonias.

Del MIC se escogieron:

- **Colonias que mueren a concentraciones de penicilina G 60 µg/ml.**

Se tomaron 30 colonias que mueren a una concentración de 60 µg/ml de PG, 15 colonias de la ventana NH y 15 colonias de la ventana COOH, las cuales se pusieron en inóculos de 5ml. de medio LB, para posteriormente purificarles el plásmido y mandar a secuenciarlos con el oligo 21-Ncol.

- **Colonias que viven a concentraciones de penicilina G 80, 90 y 100 µg/ml.**

También de este MIC se escogieron las colonias que viven hasta 80, 90 o 100 µg/ml de PG. (4 colonias de la ventana NH y 6 colonias de la ventana COOH), cada colonia se puso en un inóculo de 5 ml de medio LB líquido más los antibióticos correspondientes y se les purificó el plásmido para finalmente ser secuenciados con el oligo 21-Ncol.

V.9.3 Selección directa a penicilina G

Se sembraron en cajas de medio LB sólido con los respectivos antibióticos (Kanamicina [25 µg/ml] y cloranfenicol [20 µg/ml]) y diferentes concentraciones de PG (80, 90 y 100 µg/ml). De aquí tomamos 10 colonias de la ventana NH y 10 colonias de la ventana COOH, de las cuales se pusieron a crecer inóculos en medio LB líquido más los respectivos antibióticos durante toda la noche, para purificarles el plasmido y mandarlos a secuenciar con el oligo 21-Ncol.

V.10 Actividad enzimática

De las variantes de interés se pusieron a crecer inóculos en 5 ml de medio LB a 30°C toda la noche, se ajustaron las OD a la misma concentración a 600 nm con medio LB, la masa celular se recuperó por centrifugación a 3800 rpm por 15 minutos y se resuspendieron en 500 µl de PBS 1X. Las muestras se mantuvieron en hielo y se sonicaron 3 veces cada una de 10 segundos en un equipo SONIFER 450, posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos.

V.10.1 Determinación de la concentración de proteína

Del extracto de proteínas (sobrenadante) se tomaron 4 µl a los cuales se les agregaron 796 µl de PBS 1X y 200 µl de reactivo de Bradford (Biorad), se agitaron y se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650. Para determinar la concentración de proteínas se interpoló en una curva patrón de suero de albúmina bovina (BSA). La curva se creó tomando 1µl, 2µl, 3µl, 4µl, 8µl, 16µl y 24µl de BSA, que se aforaron a 800 µl con PBS 1X y se les añadió la solución de Bradford, se agitaron y se leyeron a 595 nm, las lecturas obtenidas se graficaron en el programa Kaleida Graph y obtuvimos la ecuación para determinar la concentración de proteína en 4 µl de cada variante.

V.10.2 Método de paradimetilaminobenzaldehido (PDAB) para la determinación de 6-APA

Este método se basa en la formación de una base de Schiff entre el PDAB y el 6-APA, que produce una coloración amarilla y puede ser detectada espectrofotométricamente. 100 µg de proteína se ajustaron a un volumen de 90 µl con PBS 1X y se incubaron por 10 minutos a 37°C, enseguida se le agregaron 10 µl de PG 20%, se dejó llevar a cabo la reacción a 37 °C por 10 minutos. La reacción se detuvo con 2.4 ml de etanol absoluto y agitación, se reveló con 1.25 ml de PDAB, se

agitó y se incubó por 15 minutos a 37°C, para finalmente ser leídos a 415 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650.

Se calculó la concentración de 6-APA por la interpolación en la curva de calibración. La curva de calibración se determinó utilizando 2 mg de 6-APA más 1000 µl de PBS 1X, a lo cual se le hicieron diluciones para dar concentraciones de 2 mg/ml, 1mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml y 0.0625 mg/ml De cada una se tomaron 100 µl los cuales se incubaron por 10 minutos a 37°C, después se les agregaron 2.4 ml de etanol absoluto y se incubaron nuevamente por 10 minutos a 37°C. Se reveló con 1.5 ml de PDAB, se incubaron 15 minutos a 37°C y se leyeron a 415 nm en un espectrofotómetro Backman DU650.

Las lecturas obtenidas se introdujeron en el programa Kaleida Graph y obtuvimos la ecuación que nos permitió calcular la concentración de 6-APA en cada una de las variantes.

La fórmula resultante fue:

$$-Y = 0.0037831 + 5.3689 X$$

Con un valor de confiabilidad de:

$$R = 0.9998$$

V.11 Colocación del TAG

Para que PGA pueda ser inmunodetectada con anticuerpos monoclonales se adicionó el TAG, que es una etiqueta o bandera de 10 aminoácidos al final de la proteína.

Esto se logro digiriendo el vector pTHIC/TAG proporcionado por el Dr. Osuna, con las enzimas *BglII*, *MluI* y *XhoI* de aquí fue tomado el fragmento *MluI/XhoI*, que contiene el decapeptido con la secuencia:

5' TCG TGG CTC GAG TCA TTA **AGA AGC GTA GTC CGG AAC GTC GTA CGG GTA** TCT CTG AAC GTG 3'

Donde los nucleótidos en negritas dan lugar a los aminoácidos que son reconocidos en la inmunohistoquímica por el anticuerpo primario.

Los vectores pT4PAC/Sac⁺ de la enzima silvestre y de las 22 variantes fueron digeridos con las enzimas *MluII/XhoI*. El fragmento más grande fue purificado. Finalmente se ligaron los 23 vectores pT4PAC/Sac⁺ con los fragmentos que contienen el TAG del pTHIC/TAG.

V.12 Inmunodetección de Penicilina G acilasa

V.12.1 Gel SDS-PAGE

Gel de proteínas, gel de poliacrilamida estandar al 12%:

	Inferior 12%	Superior 5%
H ₂ O	2.05 ml	2.1 ml
Acrilamida 30%	4 ml	0.5 ml
Tris		
pH 8.8	3.75 ml	
pH 6.4		0.38 ml
SDS 10%	100 µl	30 µl
PSA	100 µl	30 µl
TEMED	8 µl	4 µl

V.12.2 La inmunodetección

El gel SDS-PAGE se transfiere a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 400 mA en buffer de transferencia (Tris 50 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.037% y metanol 20% con pH 8.3). El papel de nitrocelulosa se queda ON a 4°C en BSA 1%, después de este tiempo se lava varias veces con PBS 1X y se le coloca el primer anticuerpo (antitag 10aa-12CA) en una dilución 1:500 en BSA 1%, durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. El papel se vuelve a lavar varias veces con PBS 1X y se le acopla el segundo anticuerpo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina 1:1000 en BSA 1%, durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. Se lava nuevamente varias veces con PBS 1X y con agua destilada, se revela con 5 µl de solución para fosfatasa alcalina, la reacción se detiene con 50 ml de EDTA 0.005 M y se lava con agua miliQ en exceso para posteriormente secar el papel de nitrocelulosa.

V.13 Re-clonación

5 variantes de la ventana NH fueron nuevamente clonadas en el plásmido pT4PAC/Sac⁺.

5000 ng de cada uno de los plásmidos
<i>NdeI/SacI</i>
<i>BSA</i>

La ligación se realiza durante 2 horas a temperatura ambiente.

300 ng pT4PAC/Sac ⁺	500 ng de cada uno de los plásmidos
--------------------------------	-------------------------------------

V.14 Análisis de la diversidad de las librerías, clonación en el vector pT4BLA/Sac⁺

V.14.1 El vector: pT4BLA/Sac⁺

El vector se digiere por 6 horas

5000 ng pT4BLA/Sac ⁺
<i>NdeI/SacI/ScaI</i>
<i>BSA</i>

La digestión se purifica por electroforesis en gel de agarosa al 1%, seguido del protocolo para purificación, se cuantificó igualmente por electroforesis.

V.14.2 La librería NH

1) La ligación

30 pmol Klenow de la 1 ^a ventana	500 ng pT4BLA/Sac ⁺
---	--------------------------------

De la ligación se tomaron 2 μ l para electroporar 10 μ l de XLI Blue electrocompetentes. Una vez que se recuperan se siembran en cajas con medio LB y antibióticos. De estas cajas se tomaron 100 colonias para hacerles inóculos y purificarles el plásmido. Para mandar a secuenciar con el oligo SecProBla.

2) 20 pmol de la librería se tomaron como molde para hacer una PCR, como oligos se utilizaron 59 SacI y 19PCRPSNH. El producto de esta PCR se purificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 % seguido del Kit para purificación de productos de PCR.

Se digieren

200 ng del producto de PCR

Para la reacción de ligación se utilizan

200 ng pT4BLA/Sac ⁺	100 ng del producto de PCR
--------------------------------	----------------------------

De la ligación se tomaron 2 μ l para electroporar 10 μ l de XLI Blue electrocompetentes. Una vez que se recuperan se siembran en cajas con medio LB y antibióticos. De estas cajas se tomaron 25 colonias para hacerles inóculos, purificarles el plásmido y mandar a secuenciar con el oligo SecProBla

V.14.3 La librería COOH

Se ligaron

500 ng pT4BLA/Sac ⁺	30 pmol de PCR de la Klenow de la 2 ^a ventana
--------------------------------	--

Se tomarón 2 μ l de la ligación y se elctroporaron a 10 μ l de células XLI Blue electrocompetentes. Después de la hora de recuperación se sembraron 200 μ l en cajas con medio LB sólido con antibiótico. De estas cajas tomamos 43 colonias, de las cuales se pusieron inóculos para después extraer el plásmido y mandarlo secuenciar con el oligo SecProBla.

V.15 Método Tat P

Recientemente, un método Tat P fue descrito para predecir la presencia y localización de variantes del péptido señal Tat, discrimina entre los péptidos señal de Sec y Tat, aunque que no contenga el motivo "Twin Arginine" (Ser/Thr, Arg, Arg, X, Phe, Leu, Lys). Así también elimina aquellas proteínas citoplasmáticas que contienen un motivo similar. Tiene 2 sistemas para la identificación: el sitio de corte y los patrones de hidrofobicidad. El servidor esta disponible en la página <http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>. El péptido señal silvestre y los péptidos señal de las variantes funcionales fueron sometidos a este servidor TatP 1.0. Donde se introdujeron por separado cada uno de los péptidos señal y se obtuvo el resultado de la búsqueda (39).

VI Resultados

VI.1 El vector pT4PAC/Sac⁺

El vector pT4PAC/Sac⁺ fue el resultado de 5 modificaciones en el vector pT4BLA, estas modificaciones se muestran en la figura 24. El vector pT4PAC/Sac⁺ tiene las siguientes características:

- ⇒ Un promotor débil de β -lactamasa
- ⇒ Un gene *pac* silvestre (WT), clonado con los sitios de restricción *NdeI/XhoI*
- ⇒ Un sitio de restricción único *SacI* al inicio de la subunidad α del gene *pac*.

VI.2 La mutagénesis al azar

El péptido señal del gen silvestre de PAC (WT) fue dividido en 2 ventanas de mutagénesis, la NH y la COOH. En experimentos separados se introdujeron en el vector pT4PAC/Sac⁺, el cual contiene el gen de PAC, un gen de resistencia a kanamicina. Se obtuvieron dos librerías de mutantes: la librería NH y la librería COOH, que contienen teóricamente 10^3 y 10^4 diferentes miembros, respectivamente.

VI.3 Variantes aisladas al azar o sin selección

De las colonias crecidas en medio LB más kanamicina, se tomaron 10 colonias (5 de cada librería). Sólo se obtuvieron 8 secuencias, 4 de cada una de las librerías. Aquí 4 (50%) colonias presentan mutaciones, 1 (12.5%) colonia porta la secuencia silvestre y 3 (37.5%) colonias presentan inserciones y/o deleciones. En 2 de las 4 secuencias que portan las mutaciones se observan también cambios en el sitio Shine Dalgarno.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
WT	M	K	N	R	N	R	M	I	V	N	C	V	T	A	S	L	M	Y	Y	W	S	L	P	A	L	A
NH 1G											F															
NH 2G												R	I													
NH 4M			H		Y						R															
COOH 2G	*	*	*	*	*	*																				
COOH 3M												*			*								*			
COOH 4M															I	A		*					S	C	Y	
COOH 5M														V	Q	G		N		C				H		

Tabla 3. Sin selección. Secuencia de colonias que contienen las librerías clonadas en el vector pT4PAC/Sac⁺, que fueron tomadas de platos con medio LB y Kanamicina, es decir sin presión de selección. Los aminoácidos sometidos a mutagenesis se indican en negritas. La línea vertical separa las regiones mutagenizadas. Las deleciones y/o inserciones son indicadas por asteriscos.

VI.4 Variantes aisladas con actividad de PGA o con selección

Utilizamos un sistema de selección basados en el hecho de que cualquier péptido señal funcional es capaz de translocar a PGA al periplasma, lo cual confiere una resistencia a penicilina G, pero se debe considerar que como resultado de la hidrólisis de penicilina G se da una acumulación de 6-APA y PAA, y que 6-APA es tóxico para la célula. Así que necesita ser degradado, lo cual es posible gracias a una β -lactamasa específica para 6-APA.

Para tal efecto las librerías NH y COOH que fueron clonadas en el plasmido pT4PAC/Sac⁺ se introdujeron en experimentos separados en la cepa XLI-Blue PACYC PKGS-9, que contiene la β -lactamasa específica para 6-APA.

VI.5 Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para penicilina G

En cajas con medio LB y kanamicina se sembraron 200 μ l de cada una de las librerías, de aquí se escogieron al azar 58 colonias (29 colonias de cada librería), estas colonias fueron sometidas a diferentes concentraciones de penicilina G, 0, 60, 70, 80, 90 y 100 μ g/ml. La resistencia a penicilina G de cada una de las colonias es mostrada en la tabla 4.

VI.6 Péptidos señal no funcionales

De las 58 colonias que fueron sometidas al MIC el cual se resume en la tabla 4, se puede ver que 25 y 22 colonias, de la librería NH y COOH respectivamente, ya no crecen a 60 µg/ml. de penicilina G. Los péptidos señales de estas 45 colonias pueden llegar a ser considerados como péptidos señal no funcionales o no mejorados, dado que están por debajo del rango del péptido señal silvestre que es de 60 µg/µl de penicilina G.

Colonia		µg de Penicilina G / µl					Colonia		µg de Penicilina G / µl				
NH		60	70	80	90	100	COOH		60	70	80	90	100
1							31	90%	80%	70%	50%	10%	
2							32						
3							33						
4							34						
5							35						
6							36	10%					
7							37	30%	10%				
8							38	10%					
9							39						
10							40	60%	50%				
11							41	60%	50%	10%			
12							42						
13							43	70%	70%	70%	50%	50%	
14							44						
15							45	30%	10%				
16							46						
17							47						
18							48	10%					
19							49	10%					
20							50						
21							51						
22							52						
23	10%						53						
24							54						
25	10%						55						
26	90%	80%	20%				56						
27	90%	80%	70%	50%			57	80%	80%	60%	50%	50%	
28	90%	80%	70%	50%	10%		58	80%	80%	60%	50%	50%	
29	90%	80%	70%	50%	10%		59	80%	80%	60%	50%	50%	

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria de Penicilina G ($MIC_{Pen G}$). Niveles de resistencia de las 58 colonias tomadas al azar, a concentraciones de 60, 70, 80, 90 y 100 µg/µl de penicilina G; 1-29 librería NH y 31-59 librería COOH. El porcentaje representa el número de colonias vivas.

De estas 46 colonias que murieron a una concentración de 60 µg/µl, se seleccionaron al azar 30 colonias, que se mandaron secuenciar y de las cuales sólo se obtuvieron 23 secuencias. Los resultados de la secuenciación muestran que: 7 secuencias son silvestres, 7 secuencias contienen deleciones y/o inserciones y 9 secuencias contienen mutaciones, de estas últimas 4 secuencias corresponden a la librería NH y 5 secuencias a la librería COOH. En la tabla 5 se representan las secuencias de las colonias que portan deleciones, inserciones y mutaciones.

VI.7 Péptidos señal funcionales

De las 58 colonias que fueron sometidas al MIC, 4 colonias (13.7%) y 8 colonias (27.5%) de la librería NH y COOH respectivamente, mostraron una resistencia mayor a 60 µg/ml de penicilina G.

De la librería NH tenemos que 1 colonia resistió 80 µg/ml de penicilina G, 1 colonia resistió 90 µg/ml de penicilina G y 2 colonias resistieron 100 µg/ml de penicilina G. En el caso de la librería COOH, encontramos 1 que soporta hasta 70 µg/ml, 1 que soporta hasta 80 µg/ml, 1 colonia que soporta hasta 90 µg/ml, y 4 colonias que soportan hasta 100 µg/ml. Una resistencia mayor a 60 µg/ml es indicativa de péptidos señal funcionales y/o mejorados, dado que sobrepasan la resistencia del péptido señal silvestre.

De las 12 colonias que muestran resistencia a una concentración mayor a 60 µg/µl se tomaron las 11 que tienen la mayor resistencia a concentraciones de PG y las colonias se mandaron secuenciar.

Se obtuvieron 10 secuencias, entre las cuales no se encontraron secuencias silvestres y solamente 2 presentaron deleciones y/o inserciones, 8 contienen mutaciones, 4 pertenecen a la librería NH, cuyos cambios se encuentran en las posiciones 4, 6, 7, 8, 10 y 13, en la posición 10 encontramos representados 3 aminoácidos. Las 4 mutantes de la librería COOH muestran los cambios en las

posiciones 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22 y 23, las posiciones 14, 15, 20, 21 y 23 se presentan en más de una clona, mostrando sustituciones por más de un amino ácido.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
WT	M	K	N	R	R	N	R	M	I	V	N	C	V	A	S	L	M	Y	Y	W	S	L	P	A	L	A	
PSNH 4						M																					
PSNH 18												Q	A														
PSNH 20			I																								
PSNH 21				M	H	C	*	D				M	V	C													
PSCOOH 32																		*				N					
PSCOOH 34															*										N		
PSCOOH 35															*	P			L				V				
PSCOOH 39																G											
PSCOOH 42																		*							G		
PSCOOH 44																									P		
PSCOOH 46																			*							M	
PSCOOH 47																S							N	W			
PSCOOH 50																*		*	T								
PSCOOH 51																									Y		
PSCOOH 53																T	N	C	M	G							

Tabla 5. Péptidos señal no funcionales. De las 46 colonias que en el MIC murieron a 60 µg/µl de penicilina G, se tomaron al azar colonias cuya secuencia se muestra en esta tabla. Los aminoácidos sometidos a mutagenesis se indican en negritas. La línea vertical separa las regiones mutagenizadas. Las deleciones o inserciones y son indicadas por asteriscos. La columna de la derecha indica la concentración mínima inhibitoria para penicilina G, esta dada en µg de penicilina G/µl.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
WT	M	K	N	R	R	N	R	M	I	V	N	C	V	A	S	L	M	Y	Y	W	S	L	P	A	L	A	
PSNH26				S					G			I															
*PSNH 27							G						C														
*PSNH2 28								N				G															
*PSNH 29												W															
PSCOOH 31																				T							
PSCOOH 40														G					*			S					
PSCOOH 43															A						N		F				
PSCOOH 57														G	L	F		L	I	Q			V				
PSCOOH 58														V	S						V	P	H				

Tabla 6. Secuencia de las colonias seleccionadas que mostraron una resistencia a concentraciones de penicilina G superiores a las de una colonia silvestre. Los aminoácidos sometidos a mutagenesis se indican en negritas. La línea vertical separa las regiones mutagenizadas. Las variantes que muestran alteraciones en el sitio Shine Dalgarno son indicadas con asteriscos.

Otro grupo perteneciente a los péptidos señal funcionales corresponden a aquellas colonias que fueron sembradas directamente a diferentes concentraciones de penicilina G 80, 90 y 100 µg/ml, sin pasar por todo el MIC, pero siguiendo el mismo principio.

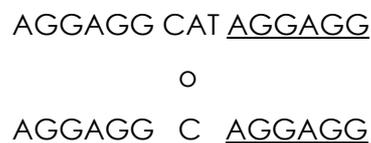
De este grupo se obtuvieron 19 secuencias las cuales se muestran en la tabla 7. 10 secuencias corresponden a la librería NH y 9 a la librería COOH. Entre estas 19 secuencias no se encontraron secuencias silvestres, solamente se encontraron 2 secuencias con deleciones y/o inserciones, una de estas variantes tiene una inserción de un trinucleótido completo entre la posición 3 y 4. Las 17 variantes restantes portan exclusivamente mutaciones, las de la librería NH se dan en las posiciones 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 13, en las posiciones 6, 7, 9, 10 y 13 se observa un reemplazamiento por mas de un aminoácido. Las mutaciones en la librería COOH se dan en las posiciones 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23, varios reemplazamientos se ven en las posiciones 14, 15, 17, 18, 19, 20 y 21.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
WT	M	K	N	R	N	R	M	I	V	N	C	V	T	A	S	L	M	Y	Y	W	S	L	P	A	L	A	
NH 100-2													F														
* NH 90-3										I																	
* NH 80-4								L		G																	
* NH 80-5										I																	
* NH 80-7			F									G															
NH 80-9								V	W		K														W		
NH 80-11											R															W	
*NH 80-13								G																		C	
* NH 80-15								V	N			G														Y	
COOH 100-1				L											C			N									
COOH 100-2															M		L	N	W							V	
COOH 90-8															I			G	A								
COOH 80-13															S					S							
COOH 100-4															A		F			Q							
COOH 100-5															V					L						V	
COOH 90-10														G	M		W		W		G						
COOH 90-11														G					T								
COOH 80-15														I	K					F	G						

Tabla 7. Secuencia de las colonias tomadas directamente de diferentes concentraciones de penicilina G. Los aminoácidos sometidos a mutagénesis se indican en negritas. La línea vertical separa las regiones mutagenizadas. Las variantes que muestran alteraciones en el sitio Shine Dalgarno son indicadas con asteriscos.

Así, el grupo de los péptidos señales funcionales esta conformado por las 7 y 18 variantes obtenidas del MIC y de colonias tomadas directamente a altas concentraciones de penicilina G, respectivamente. Para fines prácticos se eliminaron las secuencias que presentaban deleciones o inserciones, salvo aquella que contiene la inserción de un trinucleótido completo.

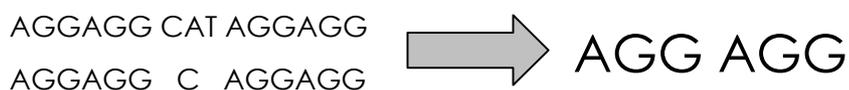
Las variantes NH90-3, NH80-4, NH80-5, NH80-7, NH80-13, NH80-15, NH27, NH28, NH29 muestran alteraciones en el sitio Shine Dalgarno, el cual se duplica y se le agregan otros nucleótidos:



En la tabla 8 se enlistan las 25 variantes que conforman el grupo de péptidos señal funcionales. Las variantes NH 27 y NH80-13 tienen la misma secuencia, por lo cual se eliminó arbitrariamente la muestra NH 27.

VI.8 Re-clonación

De las 9 secuencia que sufrían modificaciones en el Shine Dalgarno escogimos 5 al azar: NH80-4, NH80-7, NH80-15, NH27, NH28. Estas se digirieron y se volvieron a ligar para de esta manera corregir el sitio Shine Dalgarno.



Al volver a realizar el MIC para estas muestras con y sin alteraciones en el sitio Shine Dalgarno, observamos que aquellas que poseen dichas alteraciones tienen una mayor resistencia a PG, esto se puede observar cuando se les realizó el MIC; los resultados se representan en la tabla 9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
WT	M	K	N	R	N	R	M	I	V	N	C	V	T	A	S	L	M	Y	Y	W	S	L	P	A	L	A	
NH 100-2													F														
* NH 90-3										I																	
* NH 80-4								L		G																	
* NH 80-5										I																	
* NH 80-7		F									G																
NH 80-9							V	W			K		W														
NH 80-11										R			W														
*NH 80-13						G							C														
* NH 80-15						V	N				G		Y														
PSNH26				S				G			I																
*PSNH 27						G							C														
*PSNH2 28							N				G																
*PSNH 29											W																
COOH 100-1				L										C			N										
COOH 100-2														M		L	N	W				V					
COOH 90-8														I			G	A									
COOH 80-13														S						S							
COOH 100-4														A		F				Q							
COOH 100-5														V				L		V							
COOH 90-10														G	M		W		W		G						
COOH 90-11														G				T									
COOH 80-15														I	K			F	G								
PSCOOH 31																				T							
PSCOOH 43														A							N		F				
PSCOOH 57														G	L	F		L	I	Q			V				
PSCOOH 58														V	S					V	P		H				

Tabla 8. Secuencia de todas las variantes funcionales, incluye los dos grupos. Los aminoácidos sometidos a mutagenesis se indican en negritas. La línea vertical separa las regiones mutagenizadas. . Las variantes que muestran alteraciones en el sitio Shine Dalgarno son indicadas con asteriscos.

Cepa	Con secuencia Shine Dalgarno	Con secuencia Shine Dalgarno
	simple (Resistencia a µg/ml de penicilina G)	doble (Resistencia a µg/ml de penicilina G)
NH80-4	70	90
NH80-7	100	100
NH80-15	90	100
NH27	90	100
NH28	80	90

Tabla 9. Resistencia a penicilina G de mutantes con y sin alteraciones en el sitio Shine Dalgarno.

VI.9 Niveles de actividad enzimática

Todas las variantes que contienen una secuencia del péptido señal funcional y cuyo Shine Dalgarno no se encuentra alterado, fueron tomadas para realizarles la prueba de actividad enzimática.

Por medio del sistema de Bradford se cuantificó la cantidad de proteína y se tomaron 100 µg, para el ensayar la actividad de penicilina G con el método de PDAB, basado en la determinación de 6-APA por la lectura en espectrofotómetro a 415 nm (Tabla 10).

La curva de 6-APA por medio del programa Kaleida Graph nos da la ecuación:

$$-Y = 0.0037831 + 5.3689 X$$

para determinar la cantidad de 6-APA es necesario despejar X

$$X = \frac{Y + 0.0037831}{5.33689}$$

donde Y es la absorbancia del ensayo de PDAB a 415 nm, mientras que X es la cantidad de 6-APA por cada 100 µg de proteína.

VI.10 Niveles de expresión de penicilina G

En el western blot se determinó el nivel de expresión de penicilina G de cada una de las variantes a las cuales se les realizó la prueba de actividad para penicilina G, con el método de PDAB. En el análisis densitométrico de este western blot se tomó como unidad la intensidad de la banda de la enzima silvestre. Como se esperaba, los niveles de actividad enzimática coinciden con los niveles de expresión de la proteína secretada (Figura 25 y tabla 10)

No.	Variante	Lectura a 415 nm	Lectura a 415 nm (%)	µg 6-APA por 100µg de proteína	µg 6-APA por 100µg de proteína (%)	Western blot
	WT	0,1435	100	0,0274	100	1
1	NH 100-2	0,0967	67,3	0,0187	68,2	0,81
2	NH 80-11	0,2749	191,5	0,0519	189,41	2,66
3	NH 80-9	0,4172	290,6	0,0784	286,13	3,43
4	NH 80-15	0,2123	147,89	0,0402	146,71	1,88
5	NH 80-4	0,1376	95,85	0,0263	95,98	0,96
6	NH 80-13	0,3822	266,24	0,0718	262,04	2,85
7	PSNH2 28	0,2661	185,37	0,0502	183,21	2,91
8	PSNH26	0,2083	145,1	0,0395	144,16	1,93
9	NH 80-7	0,3934	274,08	0,0739	269,7	3,05
10	PSCOOH 58	0,4242	295,5	0,0797	290,87	3,36
11	COOH 80-15	0,4098	285,4	0,077	281,02	2,97
12	COOH 90-10	0,4789	333,64	0,0899	328,1	3,87
13	PSCOOH 43	0,4693	326,92	0,0881	321,53	3,43
14	COOH 90-8	0,5518	384,39	0,1034	377,37	4,03
15	COOH 80-13	0,4345	302,71	0,0816	297,81	4,24
16	PSCOOH 31	0,224	156,07	0,0424	154,74	2,31
17	COOH 100-2	0,5517	384,32	0,1034	377,37	3,49
18	COOH 100-1	0,5207	367,46	0,0976	356,2	3,37
19	COOH 100-5	0,4915	344,82	0,0922	336,49	3,25
20	COOH 100-4	0,4864	338,87	0,0913	333,21	3,06
21	PSCOOH 57	0,4677	325,8	0,0878	320,43	3,47
22	COOH 90-11	0,257	179,6	0,0485	177	2,74

Tabla 10. Niveles de actividad y expresión de la proteína PGA. La actividad enzimática es dada por la lectura a 415 nm por medio de PDAB, esta es traducida a µg de 6-APA por 100 µg de proteína, lo cual esta dado en números y porcentajes. La expresión esta dada por el análisis densitométrico al que fue sometido el Western blot, tomando como unidad la densitometría de la enzima silvestre.

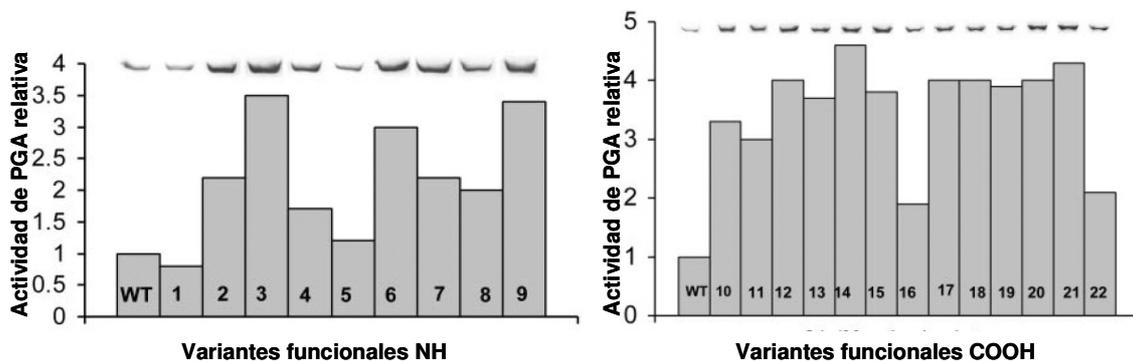


Figura 25. Actividades relativas de PAC. El nivel de expresión de las variantes es mostrada por las barras. La actividad específica de la enzima silvestre es de aproximadamente 30 µg de 6-APA por 100 µg de proteína soluble total y es tomada como unidad.

VI.11 Diversidad de la librería

Para evitar algún sesgo y lograr que la diversidad de las librerías este libre de efectos negativos causados por la expresión de PAC, la librería fue clonada en el vector pT4BLA, el cual no contiene el gen PAC, la variabilidad obtenida en las librerías es representada en la tabla 11.

Se observó que la librería NH contiene principalmente péptidos señal no mutagenizados (34 de 58), que su tasa de mutagenesis fue de 0.047, esta por debajo de la tasa de mutagénesis teórica de 0.15. La mayoría de estas variantes tienen mutaciones sencillas (75%), seguidas por dobles (16.6%) y solamente una mutante triple (4.1%).

En la librería COOH el numero de secuencias silvestres fue muy bajo (4 de 21), su tasa de mutagenesis fue de 0.33 la cual es muy cercana a la tasa de mutagenesis teorica de 0.3 y estas variantes presentan principalmente mutaciones multiples: quintuples (29%), sextuples, cuádruples y triples (17.6%), sencillas (11.7%) y dobles (5.8%).

Cuando se observa la diversidad de la librería encontramos que en la región NH, la posición 13 fue la que tuvo un mayor número de reemplazamientos en 6 de 24 variantes, con 6 distintos aminoácidos y es seguida por las posiciones 5 y 10 siendo sustituidas en 5 de 24 variantes, pero solo resultan en 4 diferentes aminoácidos.

En la región COOH la serina de la posición 15 fue reemplazada en 11 de las 17 variantes, resultando en 10 diferentes aminoácidos en esta posición, es seguida por las posiciones 24 y 25 que fueron sustituidas en 7 de 17 variantes, pero que muestran 6 y 7 aminoácidos distintos, respectivamente.

WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
	M	K	N	R	N	R	M	I	V	N	C	V	T	A	S	L	M	Y	Y	W	S	L	P	A	L	A
1, 25		C											C	G	P				I	G	S				V	
2, 26			M										C	H	Q			D	H	L	A					
3, 27				M	H	C	*	D			M			N	R								M	T		
4, 28					H									E	*		P		N						I	
5, 29						M								G	M						T	Y			L	
6, 30						F								A			N	K								
7, 31							R							D		A		C		W	N				I	
8, 32							F			G				N		F	R									S
9, 33								S						E			A								V	
10, 34									K	A			V	E					C	W					T	W
11, 35											S			P	C	*		V							E	P
12, 36											M			*	D				T			A				
13, 37											Q			I	A		*						S	C	Y	
14, 38												I			G				F	D		E			G	
15, 39											S					Q	N									
16, 40										G			F								T					
17, 41													I									I				
18												V														
19													I													
20													R													
21													N													
22													S													
23													H													
24													D													

Tabla 11. Diversidad de la librería. Los aminoácidos sometidos a mutagenesis se indican en negritas. La línea vertical separa las regiones mutagenizadas. Las variantes que muestran alteraciones en el sitio Shine Dalgarno son indicadas con asteriscos.

VI.12 Método Tat P

Desafortunadamente el método Tat P no funcionó para identificar el péptido señal silvestre o cualquiera de las variantes funcionales que aquí fueron descritas (tabla 8). Encontramos que reemplazando un par de residuos tirosina en las posiciones 18 o 19 con varios residuos, el péptido señal resultante es entonces considerado como “potencial péptido señal Tat”, sin un motivo Tat.

VII Discusiones de resultados

VII.1 Diversidad de la librería

A pesar de ser muy pequeña la muestra de variantes en pT4PAC/Sac⁺ que no fueron sometidas a selección, se puede ver una diferencia con respecto a las variantes que portan la clonación en pT4BLA, así vemos que el número de colonias no mutantes es menor en la librería P4tPAC/Sac⁺ la cual es de 12.5% comparada con el 65.5% en la librería pT4BLA. El número de mutaciones entre las variantes también es diferente, parece ser más amplio en el la librería pT4PAC/Sac⁺ dado que en 3 variantes se observan mutaciones sencillas, dobles y triples, mientras que en la librería pT4BLA encontramos principalmente mutaciones sencillas. Esto, puede indicar dos cosas que no son excluyentes: la primera es que la clonación en el vector pT4BLA fue menos eficiente que en el vector pT4PAC/Sac⁺, lo cual puede ser sustentado por el hecho de encontrar un mayor número de secuencias no mutadas en pT4BLA; la segunda es que la presencia del gen *pac* confiera una selección negativa para mutantes múltiples.

VII.2 Variantes aisladas al azar

Este fue el primer experimento y fue al principio tan solo para determinar que se había hecho bien la mutagénesis. Con éste se comprobó que efectivamente habían mutantes y no se escogieron más porque se pensó que podría haber algún sesgo si se trataba de determinar por este medio la diversidad de la librería. Al parecer cometimos un error al no tomar algunas variantes más, porque como mencionamos anteriormente no tuvimos punto de comparación, sin embargo pudieron dar una idea sobre que sí hay un sesgo, que sí hay una selección por el hecho de portar el gen de PGA.

VII.3 Variantes no funcionales

Las variantes que morían a concentraciones menores a 60 µg/µl de penicilina G, que ya hemos dicho es el rango de resistencia de la proteína silvestre, se pudo ver que la mayoría de estas variantes tienen deleciones y/o inserciones. Lo cual modifica el marco de lectura y por lo tanto, modificar proteína puede perder su función.

En la región NH tenemos 3 de estas variantes que no portan deleciones y/o inserciones, que pudieron haber disminuído o perdido su función:

a) PSNH 4 tiene 2 sustituciones, la primera en la arginina 6 que es reemplazada por una metionina y la segunda sustitución es en la treonina 13 que cambia por isoleucina. Probablemente la disminución o pérdida de función puede estar dada por la mutación en la arginina 6, ya que se ha observado en trabajos previos que cambios en en "Twin Arginine" no son permitidos, salvo que los cambios sean por lisinas.

b) PSNH 18 también tiene 2 sustituciones, la primera se da en la citosina 11 por glutamina, es decir un cambio de un aminoácido no polar por un aminoácido polar no cargado; y la segunda sustitución se da en la valina 12 por una alanina, ambos aminoácidos son no polares. Cuando comparamos con las variantes funcionales se observa que en la posición 11 sólo hay una sustitución por un aminoácido igual, no polar; mientras que en la posición 12 no se observan sustituciones, lo cual hace pensar que estas posiciones son importantes para el péptido señal.

c) En PSNH 20 las sustituciones están dadas en las posiciones 3 y 8 en la primera se sustituye una asparagina que es un aminoácido polar no cargado por una isoleucina que es un aminoácido no polar.

Cuando comparamos con las variantes funcionales vemos que no hay sustituciones, indicando que cambios en esta posición no pueden ser tolerados. En la otra posición tenemos un cambio de isoleucina un aminoácido no polar por una lisina un aminoácido básico. Cuando se compara esta posición con las variantes activas vemos que la sustitución es por glicina y triptofano, aminoácidos no polares, lo que sugiere que esta posición solo permite cambios por aminoácidos de la misma familia.

Por el otro lado en la región COOH tenemos 5 variantes que no portan deleciones y/o inserciones y que sin embargo disminuyen o pierden su resistencia a penicilina G.

a) La primera es PSCOOH 39, con una única sustitución en la posición 16, donde se sustituye una leucina por una glicina los dos aminoácidos no polares. Al compararlas con las variantes funcionales tenemos que solo hay una sustitución por fenilalanina que es también un aminoácido no polar, por lo que se deduce que en esta posición solo se permiten ciertos cambios y que no es fácilmente sustituible aunque sea por aminoácidos del mismo grupo.

b) Otra variante es PSCOOH 44 que porta una sustitución en la alanina de la posición 24 por una prolina ambos aminoácidos no polares, sin embargo entre las variantes funcionales tenemos 2 con cambios en esta posición por histidina y valina un aminoácido básico y uno no polar. Para esta posición es difícil definir que sustituciones son permisivas y cuales no, por lo que se debería aumentar el número de variantes tanto las que pierden o disminuyen función como las que la conservan o incrementan, para poder hacer este tipo de comparaciones y llegar a conclusiones.

c) En COOH 47 tenemos 3 sustituciones, la primera se da en la posición 16 de una leucina por una serina, un aminoácido no polar por un aminoácido polar no

cargado, como ya vimos esta posición no permite cambios tan fácilmente, pues ni siquiera acepta los miembros de su familia polar. La otra sustitución la tiene en la posición 23 donde se cambia la prolina por asparagina, es decir, un aminoácido no polar por un polar no cargado, sin embargo esta posición parece que permite cambios por aminoácidos de la misma familia no polar, lo cual se observa por la presencia de una fenilalanina en una variante funcional. La última posición sustituida es la posición 24 donde se sustituye una alanina por un triptofano, ambos correspondientes a la familia de aminoácidos no polares, mientras que cuando se compara con las variantes funcionales se ven 2 reemplazamientos de esta alanina por histidina que es un aminoácido polar no cargado y por una valina que es un aminoácido no polar, podría ser que esta posición permita algunas sustituciones y el hecho de que esta variante no sea funcional este dado por la acción de las otras sustituciones.

d) La variante PSCOOH 51 tiene una sustitución única en la posición 24, donde la alanina es reemplazada por tirosina, que es un aminoácido polar no cargado, prolina y triptofano que son aminoácidos no polares pero si permite cambios por una valina que es un aminoácido no polar y por histidina que es un aminoácido básico. Por lo que se insiste en una ampliación en el número de variantes a examinar, para poder distinguir que sustituciones son permitidas, ya que con esto no es suficiente para determinarlo.

e) Finalmente de este grupo tenemos a la variante PSCOOH 53 que tiene 5 sustituciones en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19, la posición que parece ser la crítica es la 16, donde se da una sustitución de la leucina por cisteína, un aminoácido igualmente no polar, pero como ya mencionamos esta posición no es fácilmente sustituible ni siquiera por miembros de la misma familia no polar. Las posiciones 15, 17, 18 y 19 parecen ser altamente sustituibles.

VII.4 Variantes funcionales

Cuando comparamos las secuencias de las variantes clonadas en pT4BLA y pT4PAC/Sac⁺, representadas en las tablas 11 y 8, se observa que algunas posiciones tienen una frecuencia de reemplazamiento mucho menor en los péptidos señal funcionales (clonados en pT4PAC/Sac⁺), tal es el caso de la posición 25 donde la leucina es sustituida por 7 aminoácidos distintos (en pT4BLA), lo cual nos da una frecuencia de mutación de alrededor de 0.41. Si la posición es irrelevante para el péptido señal, entonces, se esperaría que 5 de las 13 variantes funcionales (pT4PAC/Sac⁺) mostraran un reemplazamiento en dicha posición, sin embargo esto no ocurrió así, ya que no se encontró sustitución alguna en esta posición entre las variantes funcionales.

Otro caso, aunque menos evidente se ve en la posición 24, donde la alanina es sustituida en 7 variantes por 5 aminoácidos distintos (en pT4BLA) y en las variantes funcionales (pT4PAC/Sac⁺) solo tenemos 2 sustituciones y no 5 como se esperaría, lo que nos habla de que esta posición es importante pero que puede permitir ciertos cambios.

Un caso más está dado en la posición 16, en la que una leucina es sustituida por 5 aminoácidos distintos (pT4BLA), pero al compararse con las variantes funcionales (pT4PAC/Sac⁺) se tiene una sola sustitución y no las 3 o 4 que se esperarían, esto más el hecho de que las variantes (PSCOOH 39, 47 y 53) con sustitución en esta posición son disfuncionales, indican que la posición 16 tiene un papel importante para el péptido señal.

También se tienen las posiciones que son altamente reemplazables, como ocurre con la posición 15, que tiene 10 sustituciones con 9 aminoácidos distintos en la

librería clonada en pT4BLA y 9 sustituciones con 8 aminoácidos distintos en la librería clonada en pT4PAC/Sac⁺. En la posición 17, donde hay 4 sustituciones en pT4BLA y 3 en las variables funcionales (pT4PAC/Sac⁺). También esta la posición 18, que tiene 5 sustituciones con 4 aminoácidos distintos en pT4BLA y 6 sustituciones con 5 aminoácidos distintos en las variables funcionales 8 pT4PAC/Sac⁺). Por último tenemos las posiciones 20 y 21 donde tenemos el mismo número de sustituciones en los 2 vectores.

Con respecto a la región NH tenemos que en la librería de pT4BLA la mayoría de las posiciones tienen 1, 2 o 3 sustituciones, lo cual no nos permite determinar si hay o no una diferencia entre el número de sustituciones en las variantes funcionales. Sin embargo en la posición 12 se observa que tiene 5 sustituciones por 4 aminoácidos distintos en pT4BLA y no se observa alguna sustitución en las variantes funcionales (pT4PAC/Sac⁺), cuando se observaron las variantes no funcionales se encontraron sustituciones en esta posición, esto puede llevarnos a pensar que la posición juega un papel relevante en el péptido señal, tanto así que no se toleran cambios.

También se pueden observar posiciones que son reemplazables, como ocurre con las posiciones 13 y 7, que tienen reemplazamientos por 6 y 4 aminoácidos distintos, respectivamente en pT4BLA y en las variables funcionales (pT4PAC/Sac⁺) encontramos sustituciones por 3 aminoácidos en cada posición.

Algo interesante es que en la librería NH de variables funcionales acepta una carga mutacional alta, comparada con la variabilidad observada en el grupo clonado en pT4BLA. Estos resultados indican que esta parte del péptido señal puede tolerar una alta tasa de sustituciones. Más del 50% de las sustituciones contienen residuos aromáticos o glicinas.

VII.6 El sitio Shine Dalgarno

Finalmente se debe mencionar que en aquellas variantes en las cuales se encontraron alteraciones en el sitio Shine Dalgarno se observó una mayor resistencia a concentraciones de penicilina G, este aumento en la resistencia se vio disminuido cuando se les corrigió el sitio Shine Dalgarno por medio de una reclonación, esto se puede observar en la tabla 9. Este suceso nos indica que al recorrer el sitio Shine Dalgarno de 7 a 9 posiciones se aumenta el nivel de traducción de la proteína, debido probablemente a un aumento en la afinidad a ribosomas.

VII.7 Método Tat P

Sabemos que el péptido señal de PGA es un péptido señal Tat. Porque Tat P no lo reconoce es una buena pregunta. Y si no reconoce el péptido señal silvestre entonces, no debe sorprender que no reconozca a los de las variantes funcionales.

Esto puede responderse con el hecho de que al modificarse los residuos tirosina por diferentes residuos se le confiera el carácter de "potencial péptido señal Tat", esta predicción positiva puede deberse a que presentan una región central menos hidrofóbica que los clásicos péptidos señal. Entonces Tat P no reconoce el motivo "Twin Arginine" en estas secuencias, sino el centro hidrofóbico y el péptido señal de la enzima silvestre y de las variantes funcionales no son reconocidos por la ausencia del "twin Arginine" y la hidrofobicidad de la región central.

VIII Conclusiones

La metodología de mutagénesis por codón nos permitió crear librerías con un alto número de sustituciones, permitiendo un amplio análisis en el espacio de secuencia del péptido señal de penicilina G acilasa.

Se generaron péptidos señal que aumentan la secreción de hasta 3 o 4 veces la actividad de la enzima silvestre. Siendo las de una mayor ganancia de función las variantes cuyos reemplazamientos se dan en la región carboxilo.

Se determinó que hay aminoácidos que son libremente reemplazables, porque al sustituirse no afectan la función de la proteína, ya que estas sustituciones se pueden observar en las variantes funcionales, tal es el caso de las posiciones 15, 17, 18, 19, 20, 21 y 22.

También se determinó que hay posiciones que solamente permiten ciertos reemplazamientos, esto ocurre en las posiciones 8,11, 14 y 23, que permiten sustituciones por miembros de su misma familia de aminoácidos, ya que se encuentran sustituciones de miembros de su misma familia de aminoácidos en variantes funcionales, mientras que entre las variantes no funcionales se encuentran cambios por miembros de otras familias.

Otras posiciones que al parecer no permiten reemplazamientos, como ocurre con las posiciones 12 y 25, las cuales se vió que sí fueron sustituidas al ver la librería en pT4BLA, pero que al ver las variantes funcionales no habían sustituciones y al comparar con las no funcionales se encontraba que presentaban sustituciones. Además, encontramos las argininas en las posiciones 4 y 6, que forman el motivo "Twin Arginine", que como se sabe sólo puede ser sustituida una por lisina.

Finalmente tenemos que el recorrer el sitio Shine Dalgarno de 7 a 9 nucleótidos da un aumento en el nivel de traducción de la enzima.

IX Perspectivas

Este fue un gran trabajo, sin embargo un aumento en el número de variantes para cada grupo: variantes no funcionales, variantes funcionales y diversidad de la librería, parece ser necesario. Ya que explorar más estos bancos puede dar más información Se propone como mínimo el triple de las variantes analizadas en el caso de la librería COOH y un número mucho mayor para la librería NH.

Por otro lado, para lograr determinar si los péptidos señal funcionales son péptidos señal de Tat, se propone transformarlos en una cepa que contenga suprimido el sistema de transporte Tat, como es el caso de la cepa JARV15, que tiene una delección en Tat A y Tat E. Determinar entonces, si estas variantes ahora tienen o no la actividad de penicilina G acilasa, si tienen actividad de penicilina G acilasa, indicaría que el péptido señal no utiliza el sistema de transporte Tat para secretar a la proteína madura hacia periplasma. Pero, si no tiene dicha actividad es porque la proteína no es traslocada a periplasma y no es madura, por tanto no es activa, entonces, el péptido señal es transportado por vía Tat.

Finalmente, buscar la manera de llevar la producción a gran escala de una o varias de las mutantes, por medio de su crecimiento en un birreactor que tenga las condiciones idóneas para el crecimiento de la cepa.

X Apéndice

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, May 2006, p. 3797–3801
0099-2240/06/\$08.00+0 doi:10.1128/AEM.72.5.3797-3801.2006
Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 72, No. 5

Improvement of an Unusual Twin-Arginine Transporter Leader Peptide by a Codon-Based Randomization Approach†

Olga Monroy-Lagos, Xavier Soberon, Paul Gaytan, and Joel Osuna*

Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología/
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

Received 13 September 2005/Accepted 2 March 2006

Secretion of *Escherichia coli* penicillin acylase was improved by codon-based random mutagenesis of its signal peptide. The mutagenesis technology was applied to the gene region coding for positions Lys2 to Thr13 (N half) and Ala14 to Leu25 (C half) of the signal peptide. Protein secretion was higher in several signal peptide variants (up to fourfold with respect to the wild-type value).

Penicillin acylase (PAC) from *Escherichia coli* is an important enzyme for the production of semisynthetic antibiotics. PAC is synthesized in the bacterial cytoplasm as a precursor containing an N-terminal signal peptide, an α -subunit, a connector peptide and a β -subunit. Once the cytoplasmic precursor is translocated to the periplasm, the signal peptide is removed and the periplasmic precursor is processed by various autoproteolytic reactions (9) into the mature heterodimeric, secreted protein. Much work has been done to improve transcriptional (4), translational (4), and posttranslational (7, 13) steps to enhance the production of penicillin acylase. Ignatova and coworkers (8) recently demonstrated that the PAC signal peptide, which does not contain a typical twin-arginine motif, could still target the precursor protein to the twin-arginine transporter (Tat) system (3, 12). We previously reported a selection system based on penicillin G (PenG) resistance which requires a functional PAC in the bacterial periplasm (6). Exploiting this selection system, we aimed to optimize the leader peptide of PAC with the purpose of improving translocation. Optimization was performed by a codon-based mutational approach using the whole signal peptide. The results could be helpful for identifying functional residues and, most importantly, finding signal peptide variants that improve the secretion rate of this industrial enzyme.

The *pac* gene from *E. coli* ATCC 11105 was obtained by PCR amplification with oligonucleotides designed to add NdeI and XhoI restriction sites at the start and stop codons, respectively, and cloned into vector pT4Bla (11) (Km^r) to produce pT4BlaPAC (see Fig. S3 in the supplemental material). A new SacI restriction site at the positions coding for Ser3 and Ser4 of the mature enzyme was introduced by site-directed mutagenesis to produce plasmid pT4BlaPACSac (Fig. S3). For randomization, the *pac* gene region coding for the signal peptide was divided into two segments: the region coding for positions Lys2 to Thr13 was mutagenized under nonsaturating conditions by spiking each of the wild-type codons with a mixture of 20

codons (Table 1; see also Fig. S1), to produce the N-half library. The *pac* region coding for positions Ala14 to Leu25 was mutagenized similarly, but in this case a mixture of 20 anticodons was used (Table 1; see also Fig. S1) to produce the C-half library. Oligonucleotide synthesis conditions are briefly described below. Duplexes of the randomized regions were generated by extension of 500 pmol of complementary primer over 500 pmol of mutagenic oligonucleotide using the Klenow fragment of DNA polymerase I (Fig. S2).

For all experiments, around 40 pmol of the double-stranded and double-digested mutagenic DNA fragment was ligated to 2 pmol of the pT4BlaPACSac cloning vector using T4 DNA ligase (Fig. S4). The recombinant plasmids were electroporated into *E. coli* XL1-Blue cells already transformed with the pACYC184 vector containing a 6-amino penicillanic acid (6-APA)-specific β -lactamase (6). The transformants were spread on plates containing kanamycin, chloramphenicol, and increasing amounts of PenG (concentrations ranging from 60 μ g to 120 μ g per ml of culture media). Plasmid DNA from bacterial colonies was purified, and the *pac* gene coding for the signal peptide was sequenced.

In additional experiments, designed to assess the variability of the libraries, the mutant duplexes were cloned into an empty pT4Bla vector at the NdeI and SacI restriction sites (Fig. S4). The resultant recombinant plasmids were used to transform *E. coli* XL1-Blue cells, and some clones were randomly selected to isolate plasmids for nucleotide sequence analysis.

For protein detection (Western) experiments, a decapeptide tag (NH-Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser-COOH) was added to the end of the β domain of all resulting functional clones (22 clones). The decapeptide tag was added to each clone by replacing a BglII/XhoI fragment containing the final 913 nucleotides of the *pac* gene with a similar DNA fragment also encoding the tag (Fig. S5). The decapeptide tag is specifically recognized by the monoclonal antibody 12Ca5 (I. A. Wilson, TSRI, San Diego, CA). All final constructs were verified by DNA sequencing.

E. coli XL1-Blue was transformed by electroporation with the different expression plasmids and grown overnight with agitation at 30°C in 5 ml of LB medium containing kanamycin. Before the cells were harvested by centrifugation, the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of the cultures was measured and

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología/UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México. Phone: (52) (777) 329 1605. Fax: (52) (777) 317 2388. E-mail: joel@ibt.unam.mx.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

TABLE 1. List of trinucleotides prepared for codon and anticodon mutagenesis^a

FTP (B ₁ B ₂ B ₃)	Amino acid corresponding to:	
	Codon	Anticodon
AAA	Lys	Phe
AAC	Asn	Val
ACC	Thr	Gly
AGC	Ser	
ATA		Tyr
ATC	Ile	Asp
ATG	Met	His
CAG	Gln	Leu
CAT	His	Met
CCA		Trp
CCG	Pro	
CGC	Arg	Ala
CGG		Pro
CTG	Leu	Gln
GAA	Glu	
GAT	Asp	Ile
GCA		Cys
GCG	Ala	Arg
GCT		Ser
GGT	Gly	Thr
GTT	Val	Asn
TAT	Tyr	
TGC	Cys	
TGG	Trp	
TTC		Glu
TTT	Phe	Lys

^a List of Fmoc-protected trinucleotide phosphoramidites (FTPs) used to assemble the two mutagenic oligonucleotides reported in this study. The sense mutagenic oligonucleotide (AGG AGG CAT ATG AAA AAT CGC AAT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT GCT TCC CTG ATG) was assembled using an equimolar pool of the trinucleotides with entries in the "codon" column; codons in bold were subjected to partial mutagenesis. The antisense mutagenic oligonucleotide (AT CTC ACT TGA GCT CTG CTC AGC CAG TGC AGG TAA GCT CCA ATA ATA CAT CAG GGA AGC AGT AAC ACA GTT C) was assembled using an equimolar pool of the trinucleotides with entries in the "anticodon" column; codons in bold were subjected to partial mutagenesis. The basic structure of FTPs is shown above the table.

the cell pellets were resuspended in 50 mM phosphate-buffered saline (PBS) with the appropriate volume (around 500 μ l) in order to normalize all samples to the same OD₆₀₀. The resuspended cell pellets were disrupted by sonication, and total

and soluble (collected by centrifugation) protein fractions were taken.

Western blotting was performed according to published procedures (14). Bovine serum albumin (3%) in PBS was used to block nonspecific sites in the nitrocellulose paper. The PAC band was revealed using an anti-mouse immunoglobulin alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody and ready-to-use alkaline phosphatase liquid substrate system for membranes from Sigma (St. Louis, MO). Finally, PAC specific activity assays using total soluble protein extracts were determined under substrate saturation conditions (PenG final concentration, 2%) by the paradimethyl amino-benzaldehyde method (1).

Codon-based random amino acid substitutions in the PAC signal peptide. Six Fmoc-protected trinucleotide phosphoramidites with the sequences ATA, CCA, CGG, GCA, GCT, and TTC were chemically synthesized as described by Yáñez and coworkers (15). These trinucleotides and the 20 compounds previously described (15) are enough to prepare two mutagenic pools corresponding to 20 codons and 20 anticodons, as seen in Table 1. Each mixture can be used to modify DNA segments of either the coding or the noncoding strand, respectively, and still encode all natural amino acids. Fmoc-protected trinucleotide phosphoramidites are valuable, unique reagents that can be substoichiometrically incorporated during the ordinary assembly of oligonucleotides to produce libraries of mutagenic oligonucleotides containing wild-type and mutant codons interspersed. The Fmoc-trinucleotide approach eliminates codon redundancy as well as stop codons and allows the production of libraries of mutant proteins containing few amino acid replacements in a target region comprising several residues. The method has been thoroughly described elsewhere (6a).

For the present study, two mutagenic oligonucleotides were assembled to explore mutations along the complete *pac* signal peptide. The oligonucleotide with the sequence 5'-AGG AGG CAT ATG AAA AAT CGC AAT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT GCT TCC CTG ATG-3', encoding amino acids 2 to 13, was assembled using the pool of trinucleotides corresponding to codons. The codons subjected to replacement are those in bold. The total concentration of the mutagenic pool was 4 mM, and all their components were equimolar, yielding an average mutagenesis rate of 0.15 per substituted codon. The oligonucleotide with the sequence 5'-AT CTC ACT TGA GCT CTG CTC AGC CAG TGC AGG TAA GCT CCA ATA ATA CAT CAG GGA AGC AGT AAC ACA GTT C-3', encoding amino acids 14 to 25, was assembled using the pool of trinucleotides corresponding to anticodons. For this oligonucleotide, the codons in bold were subjected to replacement using a higher mutagenic pool concentration (8 mM) to yield on average a mutagenesis rate of 0.3 per codon. Thus, different mutagenesis rates were designed for each oligonucleotide to induce fewer amino acid changes in the N-half region and several more changes in the C-half region of the signal peptide. Finally, the wild-type *pac* gene coding for the signal peptide was replaced with a cassette coding for a library of mutagenized signal peptides (see Fig. S2 to S4 for details about the procedures). Libraries containing approximately 10⁵ different members were obtained.

TABLE 2. Library diversity

Variant(s)	Amino acid at position ^a :																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
WT	M	K	N	R	N	R	M	I	V	N	C	V	T	A	S	L	M	Y	Y	W	S	L	P	A	L	A
1, 25		C										C		G	H	P			I	H		G	S		V	
2, 26			M									C			Q			D		L		A				
3, 27				M	H	C	*	D			M			N	R								M	T		
4, 28					H									E	*		P		N				I			
5, 29						M								G	M			*			T	Y				
6, 30						F									A			N	K							
7, 31							R								D		A		C		W	N		I		
8, 32							F			G					N		F		R						S	
9, 33								S		A					E			A						V		
10, 34								K					V		P				C	W			T		W	
11, 35									S						E		*		V				E		P	
12, 36									M						P				T			A				
13, 37									Q						I			*					S	C	Y	
14, 38										I					A					F	D		E		G	
15, 39										S					G		Q	N								
16, 40										G																
17, 41												*									T					*
18, 42											V											I				
19													I													
20													R													
21													N													
22														S												
23														H												
24														D												

^a Undesigned modifications (mostly single nucleotide deletions, not shown) occurred at positions marked with an asterisk; the segments of sequence that do correspond to the design are shown properly aligned. The mutagenized regions are the regions from position 2 to 13 and from position 14 to 25. The amino acids are designated by the single-letter nomenclature.

Library diversity. Data in Table 2 show the variability that resulted from the two different mutagenic strategies. The N-half region contained mostly nonmutagenized signal peptides (34 of 58 randomly chosen variants; data not shown). The observed mutagenesis rate for this experiment (0.047) was lower than the theoretical (0.15). In contrast, we did not find a wild-type signal peptide within the randomly chosen set of C-half variants (17 clones). The actual mutagenesis rate for this experiment (0.33) was close to the theoretical (0.3). For these experiments, the mutagenic duplexes were cloned in a vector not containing the penicillin acylase gene, such that the

variability obtained is free from the known bacterial detrimental effects caused by penicillin acylase gene expression (13). It is important to note the high mutation rate that resulted in the C-half region. For instance, serine at position 15 was replaced in 11 of 17 randomly selected variants, resulting in 10 different amino acids at this position. This sequence space exploration is possible only by codon-based mutagenic methods such as the one we describe here.

PAC selection system. To identify functional signal peptides present in the libraries, we used our previously reported PAC selection system (6). Briefly, the selection system works as

TABLE 3. Functional variants

Variant(s)	Amino acid at position ^a :																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
WT	M	K	N	R	N	R	M	I	V	N	C	V	T	A	S	L	M	Y	Y	W	S	L	P	A	L	A
1, 10											F			V						V	P		H			
2, 11									R				W	I	K			F	G							
3, 12							V	W		K			W	G	M		W		W		G					
4, 13						V	N			G			Y		A					N		F				
5, 14							L		G						I			G	A							
6, 15						G							C							S						
7, 16							N			G											T					
8, 17				S					G	I					M		L	N	W			V				
9, 18			F							G					C			N								
19															V				L		V					
20															A		F			Q						
21														G	L	F				I	Q				V	
22														G						T						

^a The mutagenized regions are the regions from position 2 to 13 and from position 14 to 25. The amino acids are designated by the single-letter nomenclature.

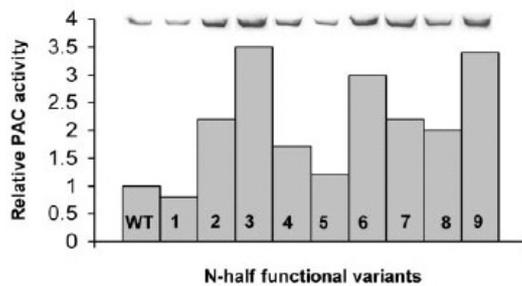


FIG. 1. Relative PAC activities of the N-half variants. The expression level of the respective variant is shown above each bar. PAC wild-type specific activity of 30 μ g of 6-APA produced per 100 μ g of total soluble protein was taken as 1. Numbers inside the bars identify the variant as described in Table 3.

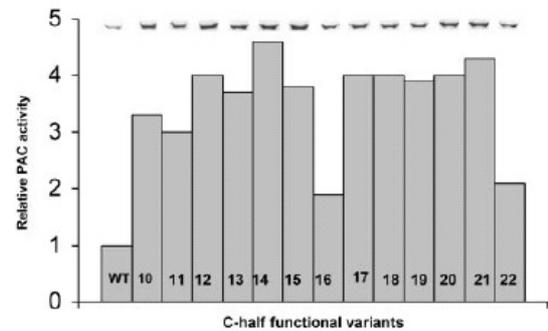


FIG. 2. Relative PAC activities of the C-half variants. The expression level of the respective variant is shown above each bar. PAC wild-type specific activity of 30 μ g of 6-APA produced per 100 μ g of total soluble protein was taken as 1. Numbers inside the bars identify the variant as described in Table 3.

follows. Any functional signal peptide able to translocate PAC to the periplasm will confer resistance to PenG because the 6-APA formed as a result of hydrolysis of PenG by PAC is then degraded by a 6-APA-specific β -lactamase expressed in the bacterial cell using a compatible plasmid. Colonies are then selected on plates containing PenG. To select for improved signal peptides, we used plates containing PenG at concentrations above the level conferred by the wild-type signal peptide (around 60 μ g/ml of PenG in the expression system described here).

PAC leader peptide functional variants. From the data in Table 2 and Table 3, we show that some amino acid positions have a very low replacement frequency among the functional signal peptides. For instance, according to Table 2, leucine at position 25 has a mutation frequency of around 0.35 (6 clones out of 17 showed a replacement at position 25). The 13 functional variants described in Table 3 for the C-half region resulted from plating approximately 50,000 colonies. If the amino acid at position 25 is irrelevant for the signal peptide function, the expectation would be that 4 out of 13 functional clones will show a replacement at this position. This was clearly not the case. Similar analyses for every position suggest that positions 14, 15, and 17 to 22 are freely replaceable residues. The mutation frequency observed for the C-half library (0.33; see above) and the small number of variants rescued during selection (13 clones [Table 3]) strongly suggest that we get only a fraction of the potential functional clones. A library size of several million different variants will be required to sample all the possible single-, double-, and triple-mutant combinations in our library. In contrast, in the N-half library, the low mutation frequency (0.047; see above) and the small number of colonies that were subjected to the selection system (around 50,000 colonies) make it impossible to reach similar conclusions. However, it is interesting that the N-half functional clones accepted a higher mutational load (8 out of 9 selected clones are at least double mutants) compared with the variability observed within the nonselected group (around 60% of the clones are single mutants [Table 2]). This result indicates that this part of the signal peptide could tolerate a high substitution rate. However, more than 50% of the replacements in the N-half functional variants contained aromatic or glycine residues. Unexpectedly, one of the best signal peptides from

this library contains a phenylalanine in the N region (Table 3, clone 9).

Recently, a method (called TatP) to predict twin-arginine signal peptides was described (2). TatP was designed to potentially predict variant Tat signal peptides not containing the consensus twin-arginine motif (Ser/Thr Arg Arg X Phe Leu Lys). Unfortunately, TatP was unsuccessful in identifying the wild-type signal peptide or any of the functional variants described herein as a twin-arginine signal peptide. However, we found that by replacing a pair of tyrosine residues at positions 18 and 19 with several different residues, the resultant signal peptide was considered a "potential Tat signal peptide" without a Tat motif. TatP positive prediction of these modified PAC signal peptides could be due to the fact that Tat signal peptides present a less hydrophobic central region than classical signal peptides (5). Further experimental work is needed to find if the identified "potential Tat signal peptides" are able to secrete the enzyme through the Tat system.

PAC expression and activity levels. Due to the stringency of the selection step, we were able to isolate mainly gain-of-function signal peptide variants (Fig. 1 and 2). The three- to fourfold enhancement in the specific PAC activity shown by almost all of the C-half variants (Fig. 1) indicates that a number of substitutions in this region make a larger improvement in the PAC secretion level than mutations in the N-half region (Fig. 2). As expected, the measured enzyme activity levels compared very well with the quantified expression levels of secreted protein (as estimated by densitometric analysis of the Western experiments).

In conclusion, a codon-based mutagenesis method allowed us to make a leader peptide engineering effort to improve PAC secretion to the bacterial periplasm. The best gain-of-function leader peptides obtained included replacements in residues from the C-half region of the signal peptide.

We thank Eugenio López, Santiago Becerra and Jorge Yáñez for the oligonucleotide synthesis and DNA sequencing and Filiberto Sánchez for technical support. We are indebted to Francisco Barona-Gómez, Humberto Flores, and the anonymous reviewers for suggestions for improving the manuscript.

This work was supported in part by DGAPA/UNAM (grant IN214803) to J.O. and by Conacyt/SEP (grant 43502-Q) to X.S. O.M.-L. was supported in part by an SNI level III scholarship.

REFERENCES

- Balasingham, K., D. Warburton, P. Dunnill, and D. Lilly. 1972. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 276:250–256.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, D. Widdick, T. Palmer, and S. Brunak. 2005. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* 6:167.
- Berks, B. C. 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* 22:393–404.
- Chou, C. P., W.-J. Lin, B.-Y. Kuo, and C.-C. Yu. 2000. Genetic strategies to enhance penicillin acylase production in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 27:766–773.
- Cristóbal, S., J.-W. de Gier, H. Nielsen, and G. von Heijne. 1999. Competition between Sec- and Tat-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 18:2982–2990.
- Flores, G., X. Soberón, and J. Osuna. 2004. Production of a fully functional, permuted single-chain penG acylase. *Protein Sci.* 13:1677–1683.
- Gaytán, R., J. Yáñez, F. Sánchez-López, H. Mackie, and X. Soberón. 1998. Combination of DMT-mononucleotide and Fmoc-trinucleotide phosphoramidites in oligonucleotide synthesis affords an automatable codon-level mutagenesis method. *Chem. Biol.* 5:519–527.
- Ignatova, Z., A. Mahsunah, M. Georgieva, and V. Kasche. 2003. Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1237–1245.
- Ignatova, Z., C. Hörnle, A. Nurk, and V. Kasche. 2002. Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:146–149.
- Kasche, V., K. Lummer, A. Nurk, E. Piotraschke, A. Rieks, S. Stoeva, and W. Voelter. 1999. Intramolecular proteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1433:76–86.
- Reference deleted.
- Osuna, J., A. Pérez-Blancas, and X. Soberón. 2002. Improving a circularly permuted TEM-1 β -lactamase by directed evolution. *Protein Eng.* 15:463–470.
- Palmer, T., F. Sargent, and B. C. Berks. 2005. Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol.* 13:175–180.
- Pan, K.-L., H.-C. Hsiao, C.-L. Weng, M.-S. Wu, and C. P. Chou. 2003. Roles of DegP in prevention of protein misfolding in the periplasm upon overexpression of penicillin acylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185:3020–3030.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350–4353.
- Yáñez, J., M. Argüello, X. Soberón, and P. Gaytán. 2004. Combinatorial codon-based amino acid substitutions. *Nucleic Acids Res.* 32:e158.

XI Bibliografía

1. Arroyo, M., de la Mata, I., Acebal, C. and Pilar, M. **Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-art.** Appl Microbiol Biotechnol. 2003. 60: 507-514.
2. Valle, F., Balbás, P., Merino, E. and Bolivar, F. **The role of penicillin amidases in nature and in industry.** TIBS. 1991. 16: 361-365.
3. Hamilton-Miller, J.M.T. **Penicillinacylase.** Bacterial Reviews. 1966. 30 (4): 761-771.
4. Flores, G., Soberón, X and Osuna J. **Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin acylase.** Protein Science. 2004. 13:
5. Schumacher, G., Sizmann, D., Haug, H. and Böck, A. **Penicillin acylase from E. Coli: unique gene-protein relation.** Nucleic Acids Research. 1986. 14(14): 5713-5727.
6. McLanahan, E. **Penicillin G Acylase. An enzyme of great pharmaceutical importance.** <http://evad.myweb.uga.edu/bcmb8010/mclanahan.pdf>
7. McVey, C.E., Walsh, M.A., Dodson, G.G., Milson, K.S. and Brannigan, J.A. **Crystal Structures of Penicillin Acylase Enzyme-substrate Complex: Structural Insights into the Catalytic Mechanism.** J. Mol. Biol. 2001. 313:139-150.
8. Alkema, W.B.L., Dijkhuis, A-J., de Vries, E. and Jassen, D.B. **The role of hidrofobia active-site residues in substrate specificity and acyl transfer activity of penicillin acylase.** Eur. J. Biochem. 2002. 269: 2093-2100.

9. Kasche, V., Lummer, K., Nurk, A., Piotraschke, E., Rieks, A., Stoeva, S. and Voelter, W. **Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli***. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999.1433: 76-86.
10. Ignatova, Z., Enfors, O., Hobbie, M., Taruttis, S., Vogt, C. and Kasche, V. **The relative importance of intracellular proteolysis and transport on the yield of periplasmic enzyme penicillin amidase in *escherichia coli***. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. 26:165-170.
11. Chou, C.P., Lin, W-J., Kuo, B-Y. and Yu, C-C. **Genetic strategies to enhance penicillin acylase production in *Escherichia coli***. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. 27: 766-773.
12. Valle, F., Gosset, G., Tenorio, B., Oliver, G. and Bolivar, F. **Characterization of the regulatory region of the *Escherichia coli* penicillin acylase structural gene**. *Gene*. 1986. 50:119-122.
13. Merino, E., Balbás, P., Recillas, F., Becerril, B., Valle, F. and Bolivar, F. **Carbon regulation and the role in nature of the *Escherichia coli* penicillin acylase (*pac*) gene**. *Molecular Microbiology*. 1992. 6(15): 2175-2182.
14. Roa, A. and García, J.L. **News insights into the regulation of the *pac* gene from *Escherichia coli* W ATCC 11105**. *FEMS Microbiology Letters*. 1999. 177:7-14.
15. Chou, C.P., Yu, C-C., Tseng, J-H. Lin, M-I. and Lin, H-K. **Genetic Manipulation to Identify Limiting Steps and Develop Strategies for High-Level Expression of Penicillin Acylase in *Escherichia coli***. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999. 63(3): 263-272.
16. Chou, C.P., Yu, C-C., Lin, L-W, Kuo, B-A. and Wang, W-C. **Novel strategy for efficient screening and construction of host/vector systems to overproduce**

- penicillin acylase in *Escherichia coli*.** Biotechnology and Bioengineering. 1999. 65(2):219-226.
17. Sriubolmas, N., Panbangred, W., Sriurairatana, S. and Meevootisom, V. **Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase.** Appl Microbiol Biotechnol. 1997. 47:373-378.
18. Ramírez, O.T., Zamora, R., Espinosa, G., Merino, E., Bolívar, F. and Quintero, R. **Kinetic study of penicillin acylase production by recombinant *E. coli* in batch cultures.** Process Biochemistry. 1994. 29:197-206.
19. Lin, Y.-H., Hsiao, C.-H. and Chou, C.P. **Strain Improvement to enhance the production of recombinant penicillin acylase in high-cell-density *Escherichia coli* cultures.** Biotechnol. Prog. 2002. 18: 1458-1461.
20. Robinson, C. and Bolhuis, A. **Protein targeting by the Twin-Arginine translocation pathway.** 2001. Nature Reviews. 2: 350-356.
21. Palmer, T. and Berks, B.C. **Moving folded proteins across the bacterial cell membrane.** 2003. Microbiology. 149: 547-556.
22. Ignatova, Z., Hörnle, C., Nurk, A. and Kasche, V. **Unusual Signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery.** 2002. Biochemical and Biophysical Research Communications. 291: 146-149.
23. Bolhuis, A., Bogsh, E. and Robinson, C. **Subunit interactions in the twin-arginine translocase complex of *Escherichia coli*.** 2000 FEBS letters. 472:88-92.
24. Sargent, F., Gohlke, U., de Leeuw, E., Stanley, N.R., Palmer, T., Saibil, H.R. and Berks, B.C. **Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layered ring structure.** 2001. Eur. J. Biochem. 268:3361-3367.

25. T Bolhuis, A., Mathers, J.E., Thomas, J.D., Barrett, C.M.L. and Robinson, C. **TatB and TatC form a functional and structural unit of the Twin- arginine translocase from *Escherichia coli*.** 2001. The Journal of Biological Chemistry. 276(23): 20213-20219.
26. Stanley, N., Findlay, K., Berks, B.C. and Palmer, T. ***Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope.** 2001. Journal of Bacteriology. 183(1):139-144
27. Ize, B., Stanley, N.R., Buchanan, G. Palmer, T. **Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity.** 2003. Molecular Microbiology. 48(5): 1183-1193.
28. Cline, K. and Mori, H. **Thylakoid Δ pH-dependent precursor proteins bind to a cp TatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport.**2001. The Journal of Cell Biology. 154:719-729.
29. Jack, R.L., Sargent, F., Berks, B.C., Sawers, G. and Palmer, T. **Constitutive expression of *escherichia coli* tat genes indicates an important role for the Twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth.** 2001. Journal of Bacteriology. 183(5):1801-1804.
30. Bruggink, A., Roos, E.C. and Vroom, E. **penicillin acylase in industrial production of β -Lactam antibiotics.** 1998. Organic Process Research & Development. 2:128-133.
31. Cristóbal, S., de Gier, J-W., Nielsen, H. and von Heijne, G. **Competition between Sec- and Tat-dependent protein translocation in *Escherichia coli*.** 1999. The EMBO Journal. 18(11)2982-2990.

32. Yáñez, J., Arguello, M., Osuna, J., Soberón, X. and Gaytán, P. **Combinatorial codon-based amino acid substitutions**. 2004. *Nucleic Acids Research*. 32(20): e158.
33. Gaytán, P., Yáñez, J., Sánchez, F., Mackie, H. and Soberón, X. **Combination of DMT-mononucleotide and Fmoc-trinucleotide phosphoramidites in oligonucleotide synthesis affords an automatable codon-level mutagenesis method**. 1998. *Chemistry and Biology*. 5:519-527.
34. Hewitt, L., Kasche, V., Lummer, K, Lewis, R.J., Murshudov, G.N., Verma, C.S., Dodson, G.G. and Wilson, K.S. **Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active-site cleft**. 2000. *J.Biol.* 302:887-898.
35. Alkema, W.B.L., de Vries, E. Floris, R. and Janssen, D.B. **Kinetics of enzyme acylation and deacylation in the penicillin acylase-catalized synthesis of β -lactam antibiotics**. 2003. *Eur. J. Biochem.* 270:3675-3683.
36. Youshko, M.I., Moody, H.M., Bukhanov, A.L., Boosten, W.H.J. and Svedas, V. **Penicillin acylase-catalized synthesis of β -lactam antibiotics in highly condensed aqueous system: beneficial impact of the kinetic substrate supersaturation**. 2004. *Biotechnology and Bioengineering*. 85(3):323-329.
37. Alkema, W.B.L., prins, A.K., de Vries, E. and Janssen, D.B. **Role of σ Arg¹⁴⁵ and β Arg²⁶³ in the active site of penicillin acylase of *Escherichia coli***. 2002. *Biochem. J.* 365:303-309.
38. Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T. and Brunak, S. **Predicction of twin-arginine signal peptides**. 2005. *BMC Bioinformatics*. 6:167.
39. Itva, Z., Mahsunah, A., Georgieva, M. And Kasche, V. **Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in**

- recombinant *Escherichia coli* strains.** 2003. Applied and Environmental Microbiology. 69(2):1237-1245.
40. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** New York, USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. Vol. 1, 2 , 3.
41. Blaudeck, N., Sprenger, G.A., Freuld, R. and Wiegert. **Specificity of signal peptide recognition in Tat-dependent bacterial protein translocation.** 2001. Journal of Bacteriology. 183(2): 604-610.
42. Bernhardt, T.G. and de Boer, P.A.J. **The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway.** 2003. Molecular Microbiology. 48(5): 1171-1182.
43. Sargent, F., Bogsch, E., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Bercks, B.C. and Palmer, T. **Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway.** 1998. The EMBO Journal. 17(13): 3640-3650.
44. Buchanan, G., Sargent, F., Berks, B.C. and Palmer, T. **A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif.** 2001. Arch Microbiol 177: 107-112.
45. Dai, M., Zhu, Y., Yang, Y., Wang, E., Xie, Y., Zhao, G. and Jiang, W. **Expression of penicillin G acylase from the cloned *pac* gene of *Escherichia coli* ATCC11105.** 2001. Eur J Biochem. 268: 1298-1303.
46. Alkema, W.B.L., Hensgens, C.M.H., Kroezinga, E.H., de Vries, E., Floris, R., van der Laan, J-M., Dijkstra, B. W. and Janssen, D.B. **Characterization of the β -lactam binding site of penicillin acylase of *Escherichia coli* by structural and site-directed mutagenesis studies.** 2000. Protein Engineering. 13(12): 857-863.

47. Saier, M.H. **Tracing pathways of transport protein evolution.** 2003. *Molecular Microbiology*. 48(5): 1145-1156.
48. Settles, A.M and Martienssen, R. **Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria.** 1998. *trends in Cell Biology*. 8: 494501.
49. DeLisa, M.P., Samuelson, P., Palmer, T. and Georgius, G. **Genetic analysis of the Twin Arginine translocator secretion pathway in bacteria.** 2002. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(33): 29825-29831.
50. PDB: 1mg. *Protein Data Bank*. Noviembre 2003.
<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pid=145911067959654&page=0&pdblid=1GM7>
51. PDB:1ea3. *Protein Data Bank*. Noviembre 2003.
<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pid=15981068774566&page=0&pdblid=1E3A>