



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATALISIS**

**DISEÑO Y CONSTRUCCION DE VARIANTES DE LA  
ENZIMA FOSFORRIBOSIL ANTRANILATO ISOMERASA  
(PRAI) CON ASAS DE ALDOLASAS CLASE I**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**BIOL. BIVIANA FLORES ESCOBAR**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. F. XAVIER SOBERON MAINERO**



**CUERNAVACA, MORELOS**

**MARZO DE 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*A mis padres y hermanos, su apoyo incondicional durante este proyecto fue vital.*

*A mis abuel@s maternos y paternos, cuyo ejemplo de vida ha sido inspirador.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM por ser mi casa durante dos años y medio.

Al Dr. Xavier Soberón por haberme aceptado en el grupo y ser mi guía durante todo este trabajo.

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Enrique Rudiño, Dr. Gabriel del Río y Dr. Xavier Soberón, por sus valiosos comentarios y sugerencias realizados durante este proyecto.

A los integrantes de mi comité revisor, Dra. Laura Palomares, Dra. Isabel Gómez, Dra. Georgina Garza – Ramos, Dr. Ricardo Grande y Dr. Xavier Soberón, por sus acertados comentarios sobre este escrito.

Al Dr. Joel Osuna, Dra Gloria Saab, Dr. Francisco Barona, Dr. Humberto Flores, Dr. Ricardo Grande, y Dra. Isabel Gómez, por ayudarme a resolver dudas en el transcurso del proyecto.

A Filiberto Sánchez, por su ayuda técnica en experimentos de este trabajo; a Juanita Ferrer por todo el trabajo y ayuda que facilitó el proyecto, y a Pancho Reyes.

A Eugenio, Jorge, Santiago y Paul integrantes de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT – UNAM, por la orientación y ayuda prestada.

A Luis Ledezma, por enseñarme a utilizar Insight, y tener mucha paciencia!.

A Adry por permitirme ser su guía, Azu por su invaluable amistad y apoyo incondicional, Gaba por ser el factor entrópico, Kary por ser una gran compañera y amiga; Arel, Lore, Maricruz y Panchito por una amistad inigualable.

A mis compañeros y amigos en el laboratorio: Manuel, Joelito, Consuelito, Lety, Mary, Alfredito, Etienne, Gabo, Anne- Laure y Adrián, por hacer agradable la estancia dentro del laboratorio.☺

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Xavier Soberón Mainero, con el apoyo de la beca CONACyT número 189747.

# INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	1
INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE TABLAS	4
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
Barriles TIM	8
PRAI como modelo de estudio	10
Aldolasas	12
Aldolasas Clase I	13
3-dehidroquinato deshidratasa, como sistema de selección	16
Evolución Dirigida	17
Anticuerpos catalíticos	19
La diversidad en los anticuerpos	20
Recombinación <i>in vivo</i>	20
ANTECEDENTES	22
La diversidad natural y la diversidad al azar	22
Migración catalítica	23
Recombinación <i>in vivo</i>	24
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
General	26
Particulares	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Diseño del Banco de Asas de las Aldolasas Clase I	27
Diseño de oligos para el banco de asas	27
Incorporación de las asas a PRAI: PCR con Megaprimer	30
Generación de la variante PRAI V124K	33
Reacciones de restricción	33
Reacciones de ligación	34
Electroporación	34
Búsqueda de clonas positivas	34
Obtención del ADN plasmídico	35
Secuenciación de los plásmidos	35
Recombinación del banco de las mutantes	35
Recombinación <i>in vivo</i>	36
Construcción de Cepas de Selección	36
Ensayos de complementación fenotípica	36
Expresión de la proteína recombinante	38
RESULTADOS	39
Construcción de JM101 $\Delta$ aroD	39
Mutación PRAI V124K	40
Ensamblaje de las asas de las Aldolasas Clase I	40
Banco de Asas	42
Ensayos preliminares de complementación fenotípica	42
Expresión de la proteína PRAI V124K	42

Recombinación del banco de asas	45
Modelamiento de PRAI con las asas	47
	48
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	54
ANEXOS	56
Anexo 1	56
REFERENCIAS	57

## INDICE DE FIGURAS

Fig. No. 1 División de función del barril TIM.	9
Fig. No. 2 Distribución de actividades de los barriles TIM	10
Fig. No. 3 Esquema de reacción de la enzima PRAI	11
Fig. No. 4 Estructura tridimensional de PRAI	12
Fig. No. 5 Representación esquemática de los residuos funcionales de aldolasa Clase I	13
Fig. No. 6 Alineamiento estructural de las enzimas que forman parte de la familia N-acetilneuraminato liasa	16
Fig. No. 7 Esquema de reacción de la enzima DHQ	17
Fig. No. 8 Evolución dirigida	18
Fig. No. 9 Esquema del experimento de recombinación	21
Fig. No. 10 Alineamiento estructural de las láminas $\beta_6$ de aldolasas Clase I con la lámina $\beta_6$ de PRAI	27
Fig. No. 11 Representación de los oligonucleótidos que se sintetizaron para ensamblar las asas de aldolasas	29
Fig. No. 12 Estrategia para la incorporación de las 2 asas a PRAI	32
Fig. No. 13 Mejoramiento del banco	33
Fig. No. 14 Método descrito por Wanner y Datsenko (2000)	38
Fig. No. 15 Ensayo de complementación fenotípica de la cepa JM101 $\Delta$ <i>aroD</i>	39
Fig. No. 16 Ensamblaje de asas de aldolasas	41
Fig. No. 17 PCRs con megaprimer en geles de agarosa al 1%	41
Fig. No. 18 Ensayos de complementación de actividad de las mutantes generadas en JM101 $\Delta$ <i>trpF</i>	44
Fig. No. 19 Ensayos de complementación de actividad de las mutantes generadas en JM101 $\Delta$ <i>aroD</i>	45
Fig. No. 20 Expresión de PRAI V124K	45
Fig. No. 21 Productos de PCR de mejoramiento del banco	46
Fig. No. 22 Alineamiento de las variantes recombinadas	47
Fig. No. 23 Modelamiento de PRAI con las asas de Aldolasas Clase I	49



## **INDICE DE TABLAS**

Tabla No. 1 Proteínas pertenecientes a la familia de las Aldolasas Clase I de acuerdo con la base de datos SCOP	15
Tabla No. 2 Oligonucleótidos sintetizados para el ensamblaje de asas de Aldolasas Clase I	29
Tabla No. 3 Estimación de la eficiencia del método de PCR con megaprimer en el ensamblaje del loop 2 y 6 de las Aldolasas Clase I	42
Tabla No. 4 Secuenciación inicial de los bancos mejorados.	47

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas, con la excepción de un grupo pequeño de moléculas de ARN catalítico, son todas proteínas y son los catalizadores biológicos más eficientes. Las enzimas desempeñan un papel esencial en diversos procesos bioquímicos, catalizando cientos de reacciones químicas, degradando nutrientes, conservando y transformando energía química, y sintetizando macromoléculas biológicas a partir de precursores más simples. Otra característica sobresaliente de las enzimas es que poseen un alto grado de especificidad por su sustrato; por otra parte, funcionan en soluciones acuosas bajo condiciones medias de temperatura y pH (Nelson y Cox, 2004). Desde luego, este extraordinario poder catalítico es el producto de la evolución natural.

Por la importancia que tienen en todo ser vivo, las proteínas siempre han sido objeto de estudio. El tener un conocimiento más profundo acerca de su estructura y propiedades permite también conocer más las funciones que desempeñan, así como las formas en que se podrían modificar, y teniendo como base el conocimiento anterior, incluso mejorarlas.

Las proteínas tienen la capacidad para evolucionar y dar origen a nuevas funciones moleculares en sistemas biológicos. Este proceso permite dar origen a una diversidad de moléculas utilizando una serie de eventos, tales como el reemplazo de aminoácidos por otros químicamente similares; duplicación, reclutamiento y fusión de genes. Ésta última parece ser más frecuente en eucariotes que en procariotes, pero no está completamente restringido a ellos (Creighton, 1992). Sin embargo hay otras rutas alternas como la oligomerización, splicing alternativo y modificaciones post – traduccionales, y es a través de la combinación de todas estos mecanismos los que llevan a la adquisición de nuevas funciones (Todd *et al.*, 2001).

Este conjunto de modificaciones en la secuencia de aminoácidos, tienen como consecuencia un cambio, ya sea pequeño o grande, en la estructura de la proteína. En la mayor parte de los casos, la divergencia de secuencia y estructura son progresivas, pero los cambios estructurales son menores que los de secuencia. Por esta razón, es posible identificar

proteínas relacionadas por similitud de secuencia, incluso si las secuencias han divergido más allá del reconocimiento (Lecomte *et al.*, 2005).

La evolución de la función enzimática de los plegamientos proteicos es también un hecho que ha sido objeto de continua especulación. Actualmente, el continuo crecimiento de los datos de genomas y estructuras proteicas ha revelado la notable versatilidad funcional de algunos plegamientos proteicos, es decir, que un solo tipo de plegamiento realice múltiples funciones. Por otro lado, se observa también que más de una solución estructural realiza una misma función, habiendo evolucionado independientemente (Todd *et al.*, 2001).

El ejemplo mejor estudiado de la diversidad funcional de los plegamientos proteicos es el caso de los barriles TIM. Estas proteínas fueron blanco de estudio de este proyecto, enfocándose especialmente hacia la fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI) y a las Aldolasas Clase I.

### **Barriles TIM**

Los barriles ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, también denominados barriles TIM, son proteínas que contienen aproximadamente 200 aminoácidos y cuya estructura consiste en una repetición del motivo lámina  $\beta$  - asa - hélice  $\alpha$ ; las láminas  $\beta$  están en el interior del barril y las hélices  $\alpha$  forman la superficie del barril (Gerlt, 2000).

Los sitios activos de los barriles TIM están siempre localizados en los extremos Carboxi – terminal de las láminas  $\beta$  (Gerlt, 2000), con los grupos funcionales del sitio activo encontrados en las asas que conectan las láminas  $\beta$  con las hélices  $\alpha$  (Norledge *et al.*, 2001). En cambio, los residuos de las asas que unen las hélices con las cadenas subsecuentes, las cuales están en el lado opuesto del barril, son importantes para estabilizar el plegamiento (Figura No. 1). Esta división de funciones entre las dos caras del barril explica que este plegamiento haya evolucionado a través de mutaciones hacia distintas actividades catalíticas sin comprometer la estabilidad del plegamiento, y permite a la vez la posibilidad de cambiar actividades catalíticas mediante ingeniería de proteínas y evolución dirigida (Urfer y Kirschner, 1992; Petsko, 2000; Sterner y Höcker, 2005).

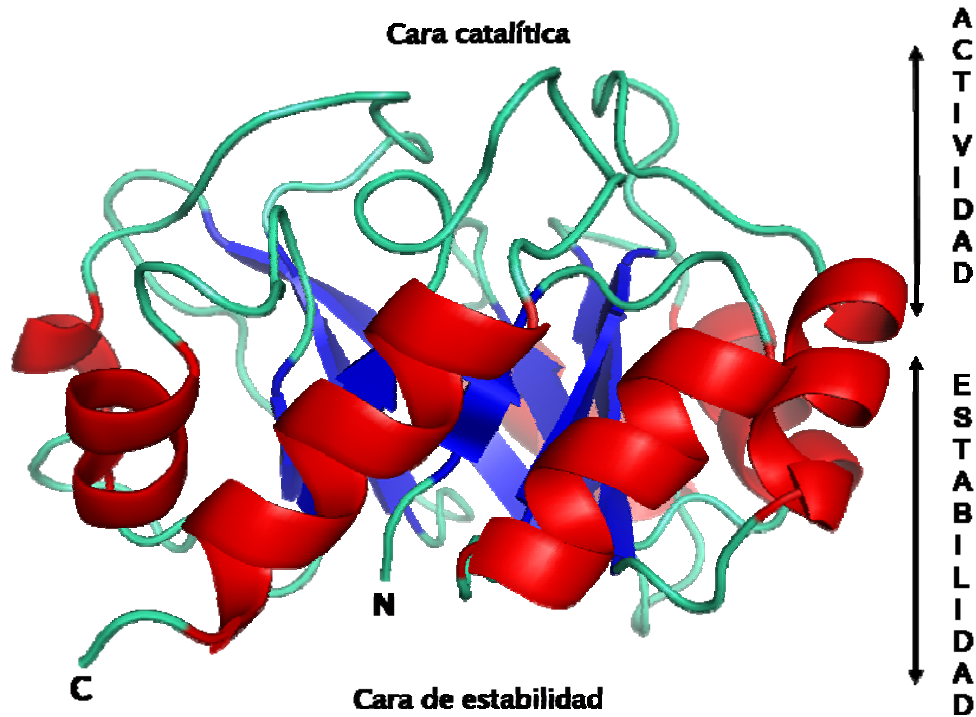


Figura No. 1 División de función en el barril. Representación de la Fosforribosil Antranilato Isomerasa monomérica de *E. coli*. Las cadenas  $\beta$  se muestran en azul y las hélices  $\alpha$  en rojo. Imagen generada en PyMol (Delano Scientific 2004)

Durante los últimos veinte años, las enzimas con estructuras de barril  $(\beta/\alpha)_8$  han generado gran interés dentro de los estudios de ingeniería de proteínas; éstas son enzimas versátiles que funcionan como oxidoreductasas, transferasas, liasas, hidrolasas e isomerasas (Nagano *et al.*, 2002; Sterner y Höcker *et al.*, 2005), es decir, cinco de las 6 actividades reportadas en la Enzyme Comisión (EC) (Figura No. 2).

De acuerdo con la base de datos SCOP (Structural Classification of Proteins), existen 32 superfamilias dentro del plegamiento de los barriles TIM. Aproximadamente el 10% de las proteínas con funciones enzimáticas poseen este plegamiento (Gerlt, 2000; Copley y Bork, 2000), y se ha especulado que surgieron ya sea como resultado de una evolución convergente a un plegamiento estable o de la evolución divergente de una proteína ancestral común de la misma estructura general, que adquirió diversas habilidades mediante procesos de mutación al azar, recombinación y selección natural (Nagano *et al.*, 2002). Esta

última hipótesis es a la fecha la más aceptada (Copley y Bork, 2000; Nagano *et al.*, 2002; Wise y Rayment, 2004).

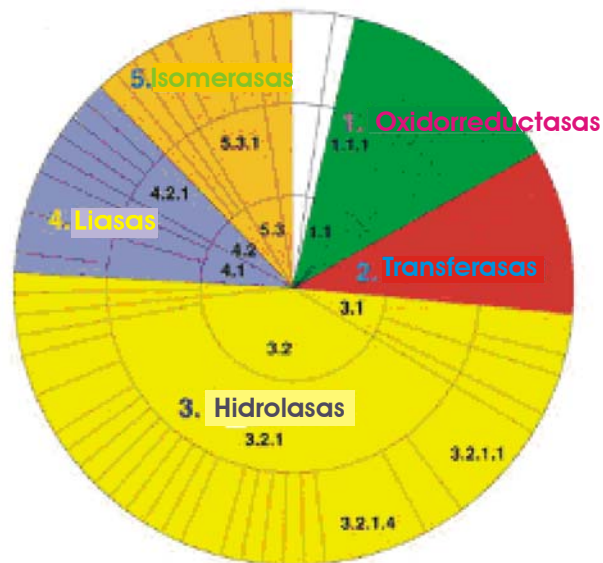


Figura No. 2 Distribución de las actividades de los barriles TIM. El área blanca, representa a los barriles TIM que no tienen actividad enzimática. Tomado de Nagano *et al.*, 2002

Una característica importante de los barriles TIM es que poseen una baja conservación de secuencia de aminoácidos; sin embargo se observa una distribución conservada de residuos polares, no polares y cargados. Esto hace imprescindible el análisis estructural de cada barril, ya que permite localizar los residuos en las posiciones topológicas equivalentes que permiten estabilizar y dirigir el plegamiento del barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>.

Aproximadamente dos terceras partes de los barriles TIM son proteínas de un solo dominio. El resto de estas estructuras forman homo-oligómeros, o forman parte de complejos multienzimáticos con mecanismos de reacción más complicados (Sternier y Höcker, 2005).

### **PRAI como modelo de estudio**

Uno de los modelos proteicos estudiados en la ingeniería de proteínas en nuestro laboratorio es la enzima N-(5' fosforribosil) antranilato isomerasa (PRAI). La versatilidad de esta enzima reside en que se encuentra fragmentada en 2,  $\beta_1\alpha_4$  y  $\beta_5\alpha_8$ , separada por el sitio de reconocimiento Cre loxP para la recombinasa del fago P1 (Mancera – Ramos, 2002).

PRAI forma parte de la ruta biosintética del triptófano, donde tres de las cuatro enzimas finales involucradas en este operón pertenecen a la familia de los barriles ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (Sterner *et al.*, 1996).

El sitio activo de PRAI se encuentra en el C – terminal del barril conformado por las asas que conectan la lámina  $\beta$  plegada 1 con la hélice  $\alpha_1$  ( $\beta_1\alpha_1$ ) y la que conecta la lámina  $\beta$  plegada 6 con la hélice  $\alpha_6$  ( $\beta_6\alpha_6$ ), además de un sitio de unión a fosfato formado por las asas  $\beta_7\alpha_7$  y  $\beta_8\alpha_8$ . Los residuos catalíticos importantes son la Cys7 y el Asp126 ubicados respectivamente en las asas mencionadas (Wilmanns *et al.*, 1992).

PRAI, codificada por el gen *trpF*, cataliza el tercer paso en la síntesis de Trp produciendo un rearrreglo de Amadori de la conversión de N-(5'-Fosforribosil)-antranilato (PRA) a 1-(o-carboxifenilamino)- I-deoxirribulosa 5-Fosfato (CdRP), como se representa en la figura No. 3.

El mecanismo general de esta reacción involucra la protonación del oxígeno del anillo de la ribosa por la Cys 7 resultando en la apertura del anillo y la formación de un intermediario imino. Este intermediario es electrofílico debido a la carga positiva del nitrógeno, así que la desprotonación del C2 por el Asp 126 puede ocurrir, llevando a la formación de un tautómero enol del producto, el cual rápidamente se tautomeriza a la forma ceto, es decir el CdRP.

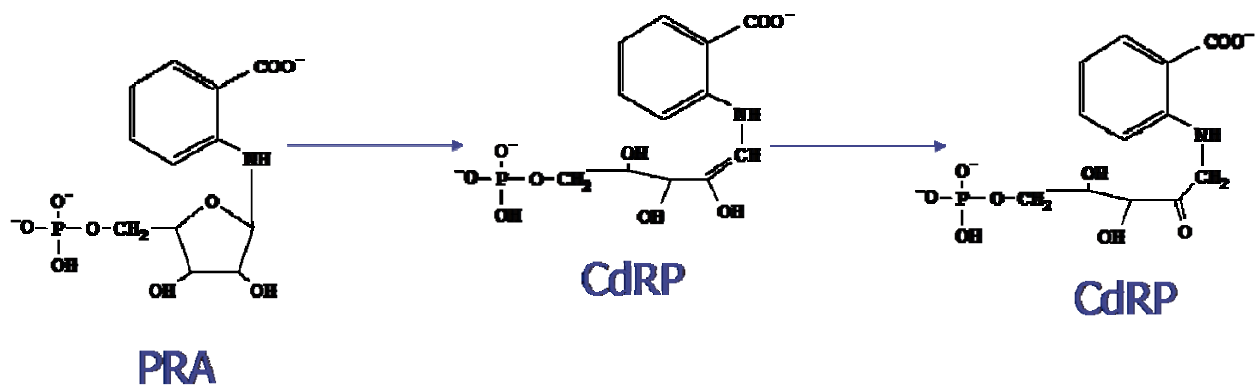


Figura No. 3 Esquema de reacción de la enzima PRAI.

La organización estructural de PRAI difiere ampliamente entre los organismos. En *Escherichia coli*, PRAI forma parte de una cadena polipeptídica bifuncional (eIGPS: PRAI) que cataliza también la reacción subsecuente (indolglícerol fosfato sintasa [eIGPS]) de la síntesis del triptófano; sin embargo, los dominios monofuncionales han sido separados genéticamente y expresados, resultando ser proteínas monoméricas estables y con actividades catalíticas idénticas a la de la cadena bifuncional (Eberhard *et al.*, 1995; Sterner *et al.*, 1996) (Figura No. 4).

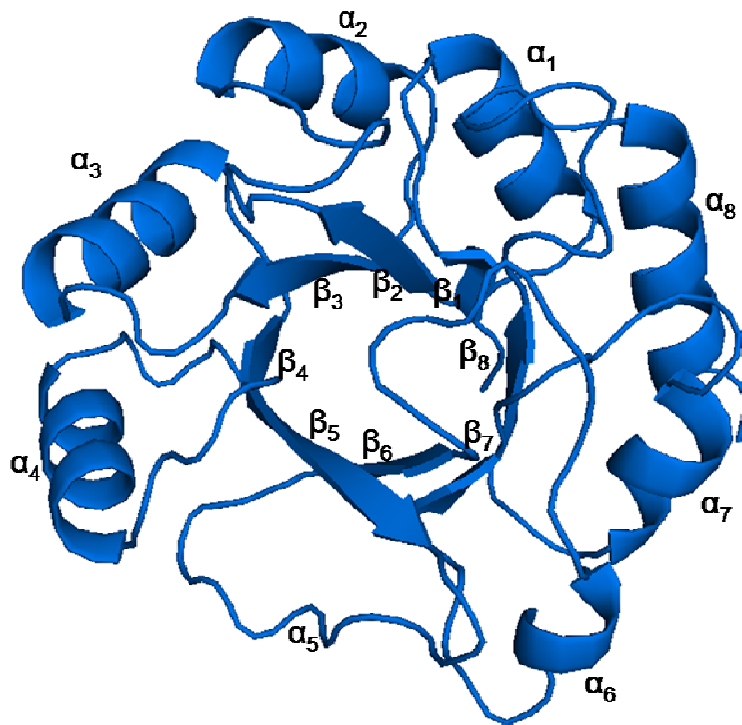


Figura No. 4 Estructura tridimensional de la Fosforribosil antranilato isomerasa monomérica de *E. coli*. Imagen generada en PyMol (Delano Scientific 2005).

### **Aldolasas**

Las aldolasas son un grupo específico de liasas que típicamente catalizan la adición estereoselectiva reversible de un donador cetónico a un aceptor aldehído. Este grupo de enzimas ha sido objeto de continuo interés porque proveen un mecanismo para la formación de enlaces carbono – carbono en los seres vivos (Allard *et al.*, 2001).

Mecanicamente pueden ser reconocidas dos clases distintas de aldolasas: las de clase I y clase II.

Las aldolasas clase I se caracterizan por la formación de un intermediario covalente, el cual es una base de Schiff protonada formada entre una lisina y un carbono del sustrato. Las aldolasas clase II requieren de un ión metálico divalente que estabilice los intermediarios de la reacción. Las aldolasas clase I y II varían en otros criterios como la afinidad por el sustrato y el perfil de pH. Ambas clases de aldolasas comparten poco o nada de identidad a nivel de secuencia y son aparentemente de orígenes evolutivos distantes (Rutter, 1964; en Schürman y Sprenger, 2000). A continuación se describirá solamente la familia de las aldolasas clase I, ya que ésta es el objeto de interés del presente estudio.

### Aldolasas Clase I

Las aldolasas clase I se pliegan en una estructura típica de barril TIM. La localización del residuo activo de lisina se encuentra en la lámina  $\beta_6$  del barril (Nagano *et al.*, 2002; Heine *et al.*, 2004; Copley y Bork, 2000), con la excepción de la transaldolasa B (Jia *et al.*, 1997) y la fructosa 6 fosfato aldolasa (Schürman y Sprenger, 2000), cuya lisina formadora de base de Schiff se encuentra en la cadena  $\beta_4$ , debido, tal vez, a una permutación circular. Las aldolasas clase I al igual que las aldolasas clase II, poseen un sitio de unión al fosfato en el extremo carboxilo de la lámina  $\beta_7$  (Copley y Bork, 2000) (Figura No. 5).

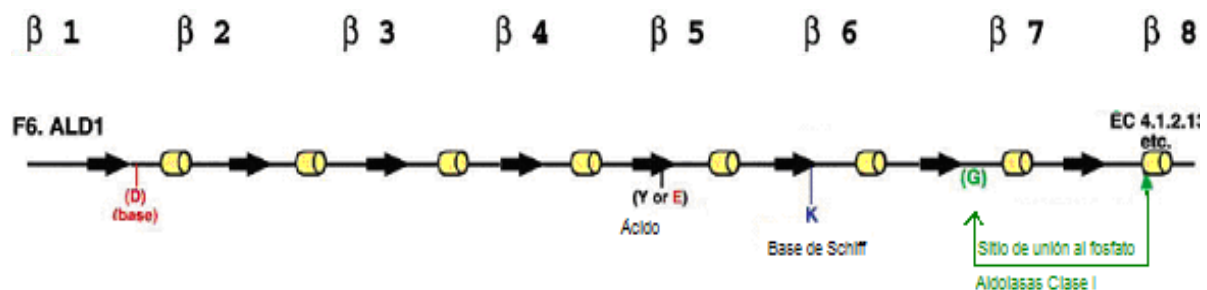


Figura No. 5. Representación esquemática de los residuos funcionales de la Aldolasa Clase I. Las ocho cadenas y hélices están indicadas con flechas negras y cilindros amarillos, respectivamente. Los sitios de unión al fosfato están indicados en verde. Los residuos ácidos y básicos involucrados en la catálisis están indicados en rojo y azul, respectivamente. Tomado de Nagano *et al.*, 2002.



De las 30 aldolasas, clase I y clase II, reportadas a la fecha en SCOP se describen 12 aldolasas Clase I, de las cuales se representan 10 en la Tabla No. 1. Los diez barriles son: Dihidrodipicolinato sintasa (DHDPS), Fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA), Fructosa 1, 6 bifosfato aldolasa Clase I (FBPA), 3-Dehidroquinato deshidratasa Tipo I (DHQ), 2-Deoxirribosa-5-fosfato aldolasa (DEOC), N-acetilneuraminato liasa (NAL), 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa (KDPGA), Transaldolasa B (TALB). La deshidratasa aminolevulínica (ALAD) y la 2-ceto-deoxigluconato aldolasa (KDGA) fueron localizadas posteriormente debido a que la deshidratasa aminolevulínica es considerada una aldolasa *híbrida* porque utiliza tanto una base de Schiff como un cofactor divalente; y la deoxigluconato aldolasa es una proteína que se encuentra relacionada estructural y mecánicamente con la N-acetilneuraminato liasa.

En el presente proyecto se realizó un banco de asas dirigido específicamente hacia una superfamilia de barriles TIM: las Aldolasas Clase I. Estas enzimas poseen una característica importante: la presencia de una lisina formadora de la base de Schiff, de la cual depende su catálisis, ésta se localiza en el extremo carboxilo terminal de la cadena  $\beta_6$  a excepción de dos enzimas con presumibles permutaciones circulares, la transaldolasa B y la fructosa 6 fosfato aldolasa que tienen dicho residuo localizado en la cadena  $\beta_4$ . Descrito de una manera general, se ensamblarán sobre un barril TIM heterólogo (la fosforribosil antranilato isomerasa; PRAI), la lisina catalítica de la cadena  $\beta_6$ , y el asa 6, de estas enzimas (a excepción de la fructosa-6-fosfato aldolasa y la transaldolasa B, de las cuales se colocará la lisina localizada en la  $\beta_4$  y los residuos correspondientes al asa 4). Vale la pena notar, en este contexto, que en la familia de la N-acetilneuraminato liasa, Dihidrodipicolinato sintasa, y 2-ceto-deoxigluconato aldolasa, existe un motivo conservado que se localiza en el asa 2 y se piensa que se encuentra involucrado en la unión a piruvato (ver más adelante, Barbosa *et al.*, 2000). Esta asa también se incluirá a la librería de esta familia, con el fin de comparar el desempeño básico de PRAI con una sola asa de aldolasa y con dos asas de aldolasa.

Tabla No. 1 Proteínas pertenecientes a la Familia de las Aldolasas Clase I de acuerdo con la base de datos SCOP.

ALDOLASA	INTERMEDIARIO FORMADOR DE LA BASE DE SCHIFF	NO. E. C.	VÍA METABÓLICA
3-dehidroquinato deshidratasa. Tipo I (DHQ)	K170 $\beta_6$	4.2.1.10	Biosíntesis de Corismato
2-deoxirribosa-5 fosfato aldolasa (DEOC)	K167 $\beta_6$	4.1.2.4	Degradación de deoxirribosas fosfato
2-ceto-3-deoxi-6 fosfogluconato aldolase (KDPGA)	K133 $\beta_6$	4.1.2.14	Entner Duodoroff
2-ceto-3-deoxygluconato aldolasa (KDGA)	K155 $\beta_6$	4.1.2.29	Entner Duodoroff
Dehidratasa Aminolevulínica (ALAD)	K195 $\beta_6$	4.2.1.24	Biosíntesis de tetrapirroles
Dihidrodipicolinato sintasa (DHPDPS)	K161 $\beta_6$	4.2.1.52	Biosíntesis de Lisina
Fructosa 6 fosfato aldolasa (FSA)	K85 $\beta_4$	4.1.2.-	Hasta la fecha no determinada
Fructosa 1, 6-bifosfato aldolasa (FBPA)	K146 $\beta_6$	4.1.2.13	Glucólisis
N-acetilneuraminato liasa (NAL)	K164 $\beta_6$	4.1.3.3	Metabolismo de Ácido Siálico
Transaldolasa B (TALB)	K132 $\beta_4$	2.2.1.2	Pentosas Fosfato

Se han descrito diversas clasificaciones de las aldolasas. De acuerdo con Barbosa *et al.*, 2000 y Heine *et al.*, 2004, existe una clasificación de las aldolasas Clase I, dependiendo si unen sustratos con grupos fosfato o carboxilatos, o ambos; mientras que Samlad y Sprenger (2006) sugieren que pueden ser clasificadas de acuerdo con el requerimiento de nucleófilos.

Las aldolasas pertenecientes a la familia de la N-acetilneuraminato liasa (NAL): Dihidrodipicolinato sintasa (DHPDPS) y 2-ceto-deoxygluconato aldolasa (KDGA), se encargan de unir piruvato durante la reacción, y de acuerdo con estudios cristalográficos, la región encargada de unirlo es el asa 2, la cual se encuentra ampliamente conservada en las 3 enzimas. (Figura No. 6)

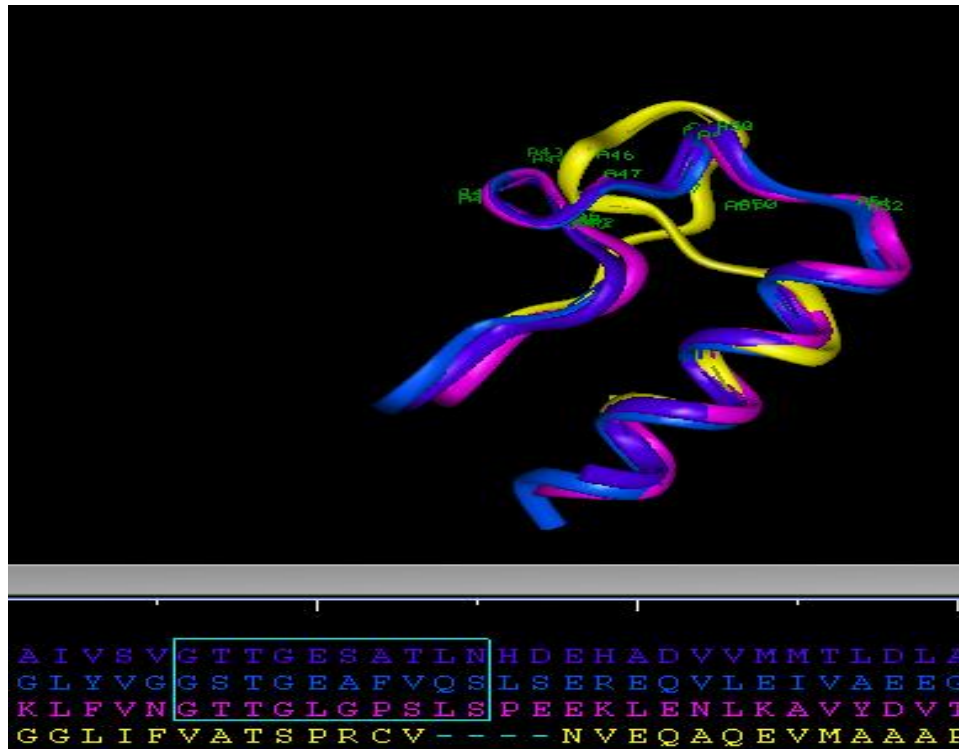


Figura No. 6 Alineamiento estructural de las enzimas que forman parte de la familia de la N-acetilneuraminato liasa con PRAI. Dihydrodipicolinato sintasa de *E coli* está representada de color lila; N-acetilneuraminato liasa de *E coli*, 2-ceto-3deoxigluconato aldolasa de *Sulfolobus solfataricus* y PRAI, de color azul, rosa y amarillo respectivamente. El recuadro azul resalta el motivo conservado en esta familia.

### 3-dehidroquinato deshidratasa, como sistema de selección

La 3-dehidroquinato deshidratasa tipo I (DHQ) es una enzima que cataliza el tercer paso en la vía de biosíntesis de shikimato. Esta enzima lleva a cabo una reacción de deshidratación reversible del ácido 3-dehidroquinico para convertirlo en ácido shikímico, utilizando un mecanismo de base de Schiff, a diferencia de la deshidroquinasa tipo II (Gourley *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002). La ausencia de la actividad de esta enzima en *Escherichia coli*, conlleva a la falla en la síntesis de aminoácidos aromáticos, razón por la cual fue elegida para eliminarse de la célula, con el fin de buscar esta actividad en las mutantes generadas. (Figura No. 7)

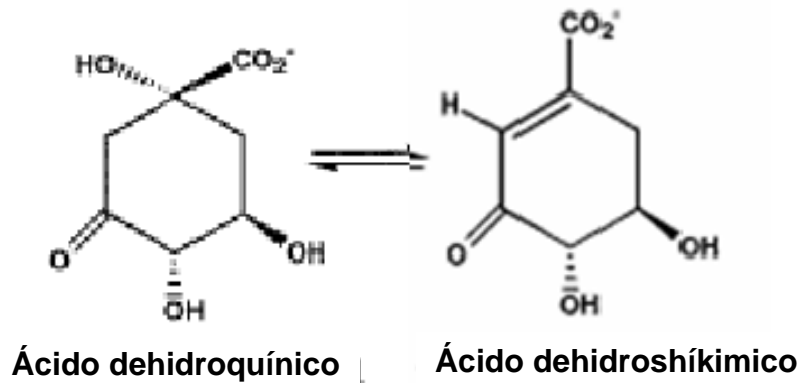


Figura No.7 Esquema de reacción llevada a cabo por DHQ.

### **Evolución Dirigida**

El rediseño de proteínas para obtener funciones deseadas es un área emergente muy prometedora en biotecnología. Este hecho ha alentado a la ingeniería de proteínas, que mediante la evolución dirigida, intenta imitar a la evolución natural, teniendo los mismos principios que ésta: variación y selección (Chen, 2001).

La evolución dirigida ha probado ser una estrategia poderosa que emplea técnicas de ADN recombinante para diseñar funciones enzimáticas no requeridas en su medio celular original (Stemmer y Holland, 2003). Mediante el empleo en la evolución dirigida de ciclos iterativos de mutación – selección, se ha tenido como resultado la obtención de enzimas más estables y más activas en un tiempo relativamente corto, desde meses a semanas (Arnold, 1998). (Figura No. 8)

La evolución dirigida es una herramienta que se ha utilizado con éxito, para acelerar la adaptación de funciones proteicas, como la estabilidad, la especificidad, o afinidad, en condiciones extremas como temperaturas inusuales (temperaturas más bajas o más altas), y en solventes orgánicos. Ha permitido el mejoramiento de la biosíntesis de proteínas recombinantes. La evolución dirigida también ha dado origen a proteínas con especificidades y actividades alteradas, interacciones moleculares mejoradas, interacciones proteína – proteína modificadas, y vías metabólicas alteradas.

En los últimos años se han publicado una amplia gama de aplicaciones de la evolución dirigida en la investigación y desarrollo de productos de tecnologías de ADN recombinante, biocatalizadores, ingeniería de vías metabólicas, farmacéuticos, e importantes aplicaciones agrícolas. Otra aplicación relevante de la evolución dirigida es la del estudio para el establecimiento de la relación estructura función en las proteínas (Yuan *et al.*, 2005).

Los métodos aplicados en la evolución dirigida, sin embargo, presentan serias limitantes, tales como la eficiencia de transformación (Saab – Rincón *et al.*, 2005), la falta de métodos adecuados de búsqueda (screening), y los mínimos locales (Arnold, 1998).

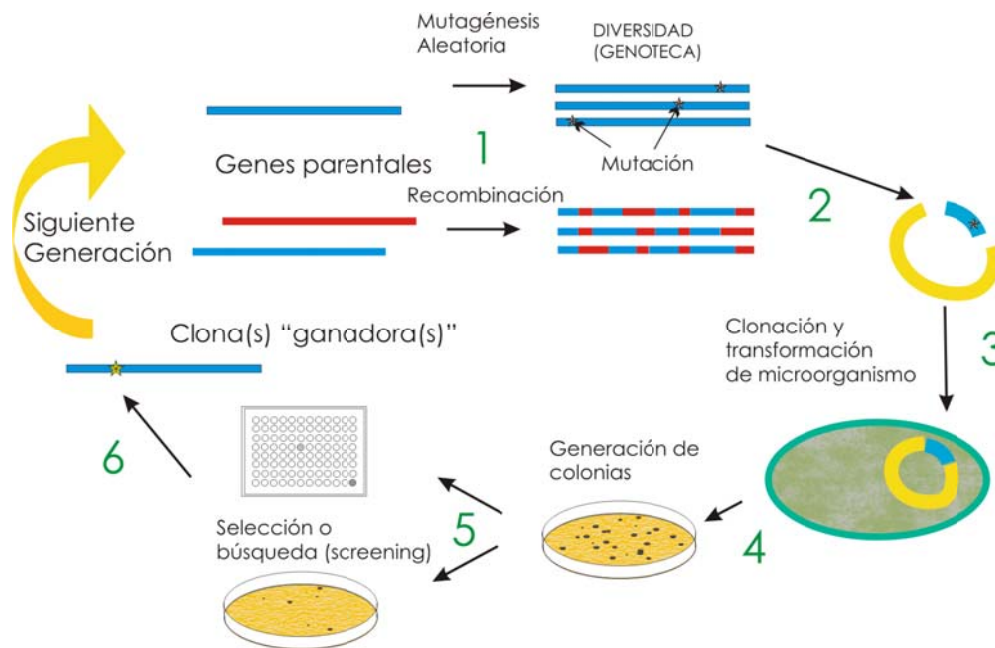


Figura No. 8 Evolución dirigida, imagen modificada de [www.imbb.forth.gr/people/bouriotis/research.html](http://www.imbb.forth.gr/people/bouriotis/research.html)

Las técnicas de evolución dirigida, tales como la mutagénesis al azar y PCR sexual, imitan a los procesos naturales de evolución, y mejoran enzimas sin entenderlas detalladamente (Hibbert y Dalby, 2005); además aprovechan la remarcada plasticidad funcional y estructural de las proteínas, permitiendo el rápido remodelamiento de éstas para que tengan funciones deseadas y mejoradas. Los avances recientes en las técnicas y estrategias utilizadas en la evolución dirigida, incluyendo el desarrollo de nuevas estrategias genéticas

y computacionales, además de una creciente información estructural que permite a la vez establecer un relación estructura – función, permiten desarrollar mejores estrategias que incrementen la probabilidad de que las secuencias mutantes generadas en el proceso tengan las propiedades deseadas (Bloom *et al.*, 2005).

A diferencia del diseño racional, que se enfoca en un pequeño número de variantes, los métodos empleados para la evolución dirigida de proteínas recaen en la generación de una vasta diversidad molecular por mutagénesis al azar y recombinación. Para realizar una búsqueda apropiada en el extenso número de moléculas generado, se utilizan métodos como la complementación genética o el screening para identificar las candidatas con mejoras en el fenotipo deseado. Múltiples iteraciones de este proceso conducen a la identificación de diversas proteínas con nuevas propiedades catalíticas, biofísicas y de reconocimiento molecular.

En este trabajo, la evolución dirigida fue la estrategia empleada para llevar a cabo la translocación de las asas de las aldolasas clase I a PRAI. Se buscó en las variantes de PRAI generadas un cambio en su actividad, teniendo como sistema de selección una cepa de *E. coli* autótrofa de la actividad de una aldolasa, la dehidroquinato dehidratasa (DHQ).

### **Anticuerpos catalíticos**

Un modelo de evolución dirigida, que resulta antecedente importante para este proyecto, es la generación de anticuerpos con actividad de aldolasa, similar a la de la superfamilia Aldolasa Clase I. Esta tecnología ha proporcionado un método para desarrollar nuevos catalizadores proteicos que catalizan una gran variedad de reacciones (Machajewski y Wong, 2006). Estos anticuerpos catalizan la reacción aldólica con eficiencia comparable a algunas enzimas naturales, y aceptan un amplio rango de sustratos. En las estructuras cristalográficas de los anticuerpos – aldolasa, 93F3 Fab A'y 33F12, en el primero se encontró que el sitio activo contiene dos residuos de lisina, y uno de ellos, Lys<sup>L89</sup>, actúa como un nucleófilo durante la reacción aldólica; en el segundo tiene sólo una lisina catalítica, Lys<sup>H93</sup>. La localización de ambos sitios activos están en cadenas alternadas con ambiente hidrofóbico similar y están en una orientación opuesta. Se ha demostrado que el

evento definitivo para la enantioselectividad de los anticuerpos catalíticos es la existencia catalítica en diferentes conformaciones (Zhu *et al.*, 2004).

### **La diversidad en los anticuerpos**

Un sistema de generación de diversidad complejo, que representa un reto importante a imitar en la evolución dirigida y modelo para este proyecto, es la del repertorio inmune en las células B y las células T, el cual involucra cinco mecanismos moleculares diferentes. Este hecho responde a la “necesidad” del sistema inmune de crear una enorme variabilidad de anticuerpos como para generar un gran número de puntos de unión diferentes y así reconocer a los millones de formas antigénicas presentes en el entorno (de Villartaray *et al.*, 2003; Roitt *et al.*, 2000). La diversidad de las asas CDR (Complementarity – Determining Regions), presente en la línea germinal, más la producida al azar en las regiones CDR3, incluyendo la mutación somática; y la combinatoria de las cadenas ligeras y pesada, dan como resultado la generación de una enorme diversidad de anticuerpos, cada uno de ellos con una especificidad antigénica diferente (Flajnik, 2002).

### **Recombinación *in vivo***

Con el propósito de trabajar con los fragmentos de barriles  $\alpha/\beta$  se utilizó una herramienta de la cual se ha comprobado su viabilidad en el laboratorio del Dr. Soberón, que permite combinar o barajar los fragmentos de PRAI. Este procedimiento permite, empleando la recombinación *in vivo*, la obtención de colecciones con números de clonas órdenes de magnitud mayores que las obtenidas por su simple expresión por separado en una misma célula (Fuentes – Gallego, P., 2002; Soberón, *et al.*, 2004). Esta estrategia puede ser utilizada en la evolución artificial de las proteínas, y se asemeja, además, a la recombinación entre exones, un fenómeno clave en la evolución natural de estas biomoléculas (Fisch *et al.*, 1996). Una ventaja que ofrece este método es que se puede llegar a superar la baja diversidad obtenida mediante las ligaciones y transfecciones. Esto es, la recombinación *in vivo* se ha propuesto como una alternativa para la creación de grandes librerías y ha resultado ser un método eficaz para aumentar la eficiencia de transformación en el laboratorio (Zahra *et al.*, 1999).

En la recombinación *in vivo* se llegan a obtener librerías de  $10^{10}$  a  $10^{12}$  variantes; este nivel de diversidad es prácticamente imposible de obtener con métodos estándar de creación de librerías, dado que las librerías 100 veces menores requieren cientos de transfecciones para poder realizarlas. La recombinación *in vivo* emplea un solo vector fagémido que contiene dos sitios lox P, y dicha recombinación es catalizada por una Cre recombinasa. Este sistema ha sido exitosamente empleado para recombinar cadenas ligeras y pesadas de una librería de anticuerpos *in vivo* (Sblattero y Bradbury, 2000). En este laboratorio se ha extendido para utilizarlo en la generación de librerías de enzimas (ver figura No. 9), específicamente en un barril TIM, empleándose para crear un sistema genético que permita la obtención de grandes librerías de variantes e incrementar la utilidad de un barril TIM en estudios de evolución dirigida (Saab – Rincón *et al.*, 2005).

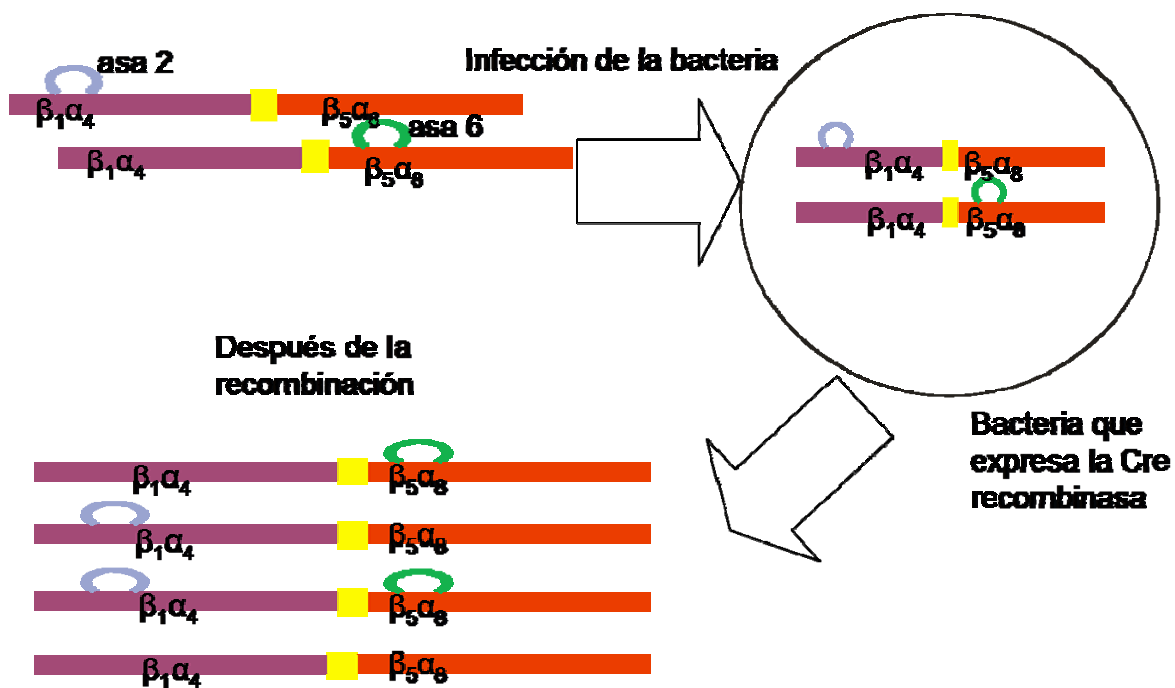


Figura No. 9 Esquema del experimento de recombinación. Dos fagémidos conteniendo las variantes de PRAI con las asas 2 y 6, y son agregados a una cepa bacteriana que expresa la Cre recombinasa, la región amarilla corresponde al sitio loxP.



## **RESUMEN**

El diseño de enzimas con nuevas funciones es el reto más importante en la ingeniería de proteínas. En este trabajo se incorporaron dos conjuntos de asas de enzimas pertenecientes a la familia de las Aldolasas Clase I, todas las cuales tienen un plegamiento de barril TIM, sobre la Fosforribosil Antranilato Isomerasa (PRAI); además, se adicionaron mutaciones puntuales para el ajuste de estos elementos funcionales. Usando este método, fuimos capaces de observar que las variantes resultantes perdían completamente la actividad original de PRAI. En los ensayos de complementación en la cepa auxótrofa de la Dehidroquinato Dehidratasa (DHQ) no se encontró ninguna variante activa; sin embargo fue posible observar que al menos una de las variantes fue localizada en la fracción celular soluble. Como paso final en este proyecto, “reconstruimos” los pequeños bancos generados con el fin de incrementar la eficiencia durante la recombinación de estas variantes. Estas construcciones serán puntos de partida para realizar una mejor exploración del espacio de secuencia y generar repertorios más numerosos de variantes recombinadas.

## **ABSTRACT**

The design of enzymes with new functions is the most challenging goal in protein engineering. In this work we incorporated two sets of loops from Class I Aldolase enzymes, all of which have a TIM barrel fold, onto Phosphoribosyl Anthranilate Isomerase (PRAI); furthermore, we added point mutations to adjust these functional elements. Using this method, we observed that the resulting variants completely lost their original activity (PRAI). During genetic complementation essays in the Dehydroquinase Dehidratase (DHQ) auxotroph strain; we were not able to find any active variant; however it was possible to locate a variant in the soluble cell fraction. As a final step in this project, we “rebuilt” the original constructs mini banks in order to increase the efficiency during the recombination of these mutants. These constructions will be starting points to do an improved sequence space exploration and to generate larger repertoires of recombined variants.

## ANTECEDENTES

### **La diversidad natural y la diversidad al azar**

Actualmente los cambios de actividad y de especificidad de sustrato para buscar nuevas actividades enzimáticas se han convertido en el reto más importante de la ingeniería de proteínas. Esto se da en un contexto de notable incremento del conocimiento estructural de las proteínas, permitiendo además incorporar algunos elementos de diseño en los cambios en la secuencia aminoacídica y en la arquitectura del sitio activo.

Es también muy importante destacar que la diversidad de las secuencias naturales nos provee de una fuente de variación muy importante, ya que ésta ha sido probada y comprobada a través del tiempo, siendo el producto de la evolución natural (Minshull y Stemmer, 1999).

Por lo anterior, hemos pensado que la diversidad de las asas catalíticas de los barriles TIM es una importante área de estudio, no sólo porque, al igual que en el extremo carboxilo de las cadenas  $\beta$ , en ellas se concentran los residuos catalíticos de la enzima, sino también por el hecho de que han sido seleccionadas bajo distintas presiones evolutivas, y han resultado ser las más adecuadas para la actividad de la enzima en el contexto de la supervivencia del organismo. La creación de una biblioteca de asas de barriles TIM, aldolasas clase I, nos permitirá conocer si la generación de diversidad a partir de secuencias naturales ya existentes puede resultar en la modificación de la actividad de una proteína con el mismo plegamiento pero con catálisis diferente.

La diversidad natural puede ser introducida mediante diversos métodos, siendo el más importante el barajeo de ADN (*DNA shuffling*) (Stemmer, 1994) y el SIAFE (Park *et al*, 2006). En este último se realizan cambios estructurales más grandes mediante la movilización de asas catalíticas, logrando mejorar significativamente la efectividad de la evolución dirigida, produciendo un caso exitoso y alentador dentro de ésta.

## **Migración catalítica**

Hemos denominado migración catalítica al proceso donde se realizan una serie de modificaciones en una enzima, dando como resultado un cambio en la actividad de ésta, sin afectar su estructura fundamental. Dichas modificaciones pueden ser desde mutaciones puntuales hasta mutaciones que involucren la movilización de estructuras secundarias proteicas.

Actualmente, en el laboratorio del Dr. Xavier Soberón se lleva a cabo un proyecto que intenta llevar a cabo la migración catalítica de un grupo de proteínas que presentan la estructura de barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, mediante la creación de bibliotecas de asas de estas enzimas. En dicho proyecto se están ensamblando las asas de 8 barriles TIM con diferentes actividades, pertenecientes a otras superfamilias. Se han construido los primeros bancos de asas, los cuales incluyen a las asas 2, 4 y 6 de las ocho enzimas seleccionadas.

El incremento del conocimiento estructural de las proteínas ha permitido diseñar cambios en la secuencia aminoacídica y en la arquitectura del sitio activo, incrementando considerablemente la posibilidad de realizar cambios de especificidad de sustrato y migración catalítica. A continuación se presentarán algunos trabajos realizados, por otros grupos de investigación, relacionados con este proyecto anteriores a su inicio, y los que se publicaron posteriormente serán presentados en la discusión.

El grupo de Joerger *et al.*, (2003) realizó mutaciones sitio dirigidas para hacer una migración catalítica de la N-acetilneuraminato liasa (NAL) para que realizara la actividad de dihidrodipicolinato sintasa (DHDPS). Ambas enzimas comparten un paso catalítico. La nueva actividad fue introducida mediante diseño racional en la estructura del NAL. Se observó un incremento en la actividad de DHDPS de 19 veces definido para la constante de especificidad, con una sola mutación.

Por otro lado, Leopoldseder *et al.*, (2004) mutagenizó a saturación el ácido aspártico 127 y 130 de las proteínas HisA e HisF, respectivamente, de *Thermotoga maritima* para confirmar si existía un cambio en la catálisis de ambas enzimas hacia la actividad de PRAI

(*trpF* fosforribosil antranilato isomerasa), observando que se obtiene dicho cambio sólo cuando se sustituye con una valina, probablemente porque modifica la carga negativa de esas posiciones y permite la entrada del sustrato al sitio activo de estas enzimas. Este hallazgo permitió establecer que PRAI, HisA e HisF son probables descendientes de un ancestro común.

Otro estudio importante sobre la migración catalítica es el realizado por Peimbert *et al.*, (2003), donde se exploró la posibilidad de cambiar la catálisis de una DD transpeptidasa en una  $\beta$  – lactamasa. Ambas enzimas comparten el mismo plegamiento, pequeñas firmas en el sitio activo y mecanismo de acilación. La migración catalítica se logró mediante una estrategia que combinaba la evolución dirigida con la ingeniería de proteínas la mutagénesis en 3 sitios localizados en el sitio activo, resultando en un aumento de 10 veces en la resistencia a cefotaxima debido a la actividad de lactamasa adquirida por la enzima mutante.

### **Recombinación *in vivo***

En nuestro grupo se ha desarrollado un sistema de variabilidad por recombinación *in vivo* mediante la interrupción del gen de la fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI) de *E. coli*, la cual fue obtenida por cortes en tres diferentes posiciones para producir fragmentos con distintas combinaciones de subunidades ( $\beta/\alpha$ ). Estas construcciones fueron hechas para comprobar la complementación *in vivo* en un sistema separado de expresión fagémido/plásmido y fue adicionado un zipper de leucina para reforzar la interacción de dichas construcciones (Soberón *et al.*, 2004).

En estudios posteriores, los fragmentos que corresponden a las mitades de PRAI,  $\beta_1\alpha_4$  y  $\beta_5\alpha_8$ , han permitido realizar estudios de recombinación *in vivo* arrojando resultados alentadores al aumentar la eficiencia de transformación y obtención de mutantes recombinadas (Saab – Rincón *et al.*, 2005).

La recombinación se ha propuesto como una alternativa para la obtención de grandes bibliotecas. En un inicio, fue utilizada para generar variantes de cadenas de anticuerpos, y

actualmente, se han reportado estudios que muestran la enorme fuente de variación en este sistema (Zahra *et al.*, 1999; Sblattero y Bradbury, 2000). Recientemente se utilizó en PRAI (Mancera – Ramos, 2002; Saab – Rincón *et al.*, 2005). Las recombinasas, es decir, las enzimas encargadas de catalizar la recombinación que se han utilizado para llevar a cabo dichos estudios, sólo son dos: la recombinasa del fago lambda, en el caso para recombinar Fabs, y la Cre recombinasa del fago P1, la cual forma parte del sistema del recombinación más usado. Este último sistema está compuesto por sólo dos componentes: dos sitios de reconocimiento lox P, el cual es una secuencia constituida por dos secuencias invertidas de 13 bp y una secuencia central de 8 bp, y la recombinasa Cre. El sistema creado por Sblattero y Bradbury (2000) emplea un sitio lox P mutado que impide la completa escisión del fragmento del péptido que se desea recombinar, y permite el barajeo de éste.

## **HIPÓTESIS**

La biblioteca de las asas 2 y 6 de aldolasas clase I, incorporadas a PRAI, tendrá una mayor probabilidad de generar variantes funcionales que la biblioteca de mutantes de PRAI con una sola asa.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Comparar bibliotecas de variantes de las asas de la familia de las Aldolasas Clase I incorporadas a la Fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI) que complementen en la cepa de *E. coli* auxótrofa de la actividad Dehidroquinato Dehidratasa (DHQ).

### **Particulares**

1. Realizar la variante de PRAI que posee la sustitución Valina 124 → Lisina.
2. Obtener un banco de secuencias de ADN de las asas 2 y 6, más las secuencias que adaptan el asa a PRAI
3. Generar mutaciones en el segundo residuo del extremo amino del asa 6 de los diferentes barriles.
4. Incorporar diversidad al azar en la región carboxilo del asa 2.
5. Obtener una biblioteca de variantes de PRAI con las asas incorporadas de las aldolasas Clase I por medio del sistema de recombinación *in vivo* Cre – lox P.
6. Seleccionar las clonas positivas en las cepas de selección JM101  $\Delta$ *aroD* y JM101  $\Delta$ *trpF*.
7. Comparar las eficiencias de las bibliotecas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del Banco de Asas de las Aldolasas Clase I

Se realizó una búsqueda para encontrar a las proteínas pertenecientes a las aldolasas Clase I. De acuerdo con la base de datos SCOP (Structural Classification of Proteins, <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>), dentro de la superfamilia de las aldolasas, la familia de las aldolasas Clase I se encuentra representada por 8 “dominios proteicos”.

Las estructuras de los 10 barriles TIM aldolasas clase I seleccionados fueron obtenidas del Protein DataBank.

### Diseño de oligos para el banco de asas

Se realizaron alineamientos estructurales de las hojas  $\beta_2$  y  $\beta_6$  de las aldolasas contra PRAI, utilizando el programa InsightII 2000 (Accelrys). Esto es con el fin de comparar la homología estructural de las aldolasas y nos permitió diseñar los oligonucleótidos que correspondieron a las secuencias de las asas 2 y 6 de las Aldolasas Clase I. (Figura No. 10)

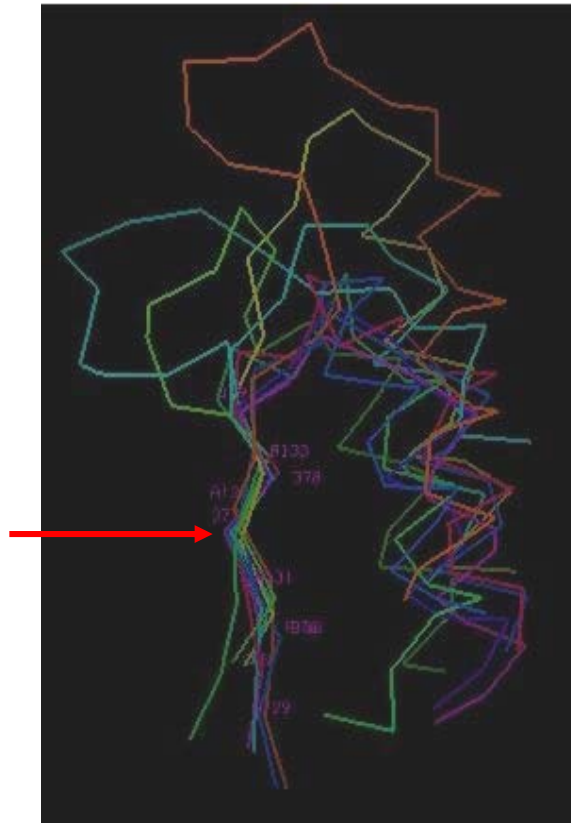


Figura No. 10 Alineamiento estructural de las  $\beta_6$  de Aldolasas Clase I con la  $\beta_6$  de PRAI. PRAI se encuentra coloreada de azul cian, la dihidrodipicolinato sintasa, la 2 ceto

deoxigluconato aldolasa y la n-acetilneuraminato liasa de azul intenso, violeta y rosa respectivamente; la deoxirribosa fosfato aldolasa de amarillo, la transaldolasa B de verde intenso, la deshidratasa aminolevulínica de verde claro, la fructosa bifosfato aldolasa de naranja y la fructosa 6 fosfato aldolasa de rojo. La flecha roja indica la localización de la sustitución de la Valina 124 de PRAI por una lisina, la que forma la base de Schiff localizada en esa posición en las aldolasas.

Se sintetizaron 3 oligonucleótidos específicos para cada asa, y 2 oligonucleótidos que sirven como adaptadores a PRAI generales. Los 3 primeros corresponden: uno, a la secuencia del asa, el segundo oligo hibrida con el ancla izquierda y el asa, el tercer oligo hibrida con el oligo del asa y el ancla derecha. Las anclas o adaptadores corresponden a la  $\beta$  plegada de PRAI y a la hélice  $\alpha$  de PRAI (Tabla No. 2).

Tabla No. 2 Oligonucleótidos Sintetizados para el Ensamblaje de Asas de Aldolasas Clase I. Las letras en negritas dentro de la secuencia nucleotídica corresponden al sitio mutagenizado.

Oligos Asa 2 de aldolasas		5'→3'
B2 Ancla	TAC GGT GGG TTG ATT TTT	
A2 Ancla	GTT GAA CAG GCG CAG GAA G	
<b>DHDPS2</b>	GGC ACC ACC GGC GAG TGC GCT ACC CTG AAC CAT <b>NNS</b> GAA	
Band Aid Izq	CTC GCC GGT GGT GCC AAA AAT CAA CC	
Band Aid Der	CGC CTG TTC AAC TTC SNN ATG GTT CAG GGT	
<b>KDGA2</b>	GGC ACC ACC GGC CTG GGC CCG AGC CTG AGC CCG <b>NNS</b> GAA	
Band Aid Izq	CAG GCC GGT GGT GCC AAA AAT CAA CC	
Band Aid Der	CGC CTG TTC AAC TTC SNN CGG GCT CAG GCT	
<b>NAL2</b>	GGC AGC ACC GGC GAA AAC TTC ATG CTC AGC ACC <b>NNS</b> GAA	
Band Aid Izq	TTC GCC GGT GCT GCC AAA AAT CAA CC	
Band Aid Der	CGC CTG TTC AAC TTC SNN GGT GCT GAG CAT	

Oligonucleótidos Asa 6 de aldolasas		
Aldolasa	Secuencia nucleotídica	5'→3'
B6 Ancla V→K	GTC CAG <b>TTT</b> ATA TTT ATC AAC GTG C	
A6 Ancla	GA TTG ACC ATT TAA TAG TGA CCA	
<b>DHQ</b>	CAC ATC GTA TTT GCT CTG <b>SNN</b> GAT	MPQSKHDV
BADHQ Der	TAT AAA CTG GAC ATG <b>NNS</b> CAG A	
BADHQ Izq	AAA CAT GAT GTG TGG TCA CTA TTA	
<b>DEOC</b>	CGC GTT CAC CGC CAC TTT <b>SNN</b> GGT	TGKVAVNA
BADEOC Der	TAT AAA CTG GAC ACC <b>NNS</b> AAA GTG	
BADEOC Izq	CG GTG AAC GCG TGG TCA CTA TTA	
<b>ALAD</b>	ATA CGC GCC <b>SNN</b> CGG	PAGAY



BALAD	TAT AAA CTG GAC CCG NNS GGC GCG TAT TGG TCA CTA TTA	
<b>DHDPS</b>	CAG GTT SNN TGT	TGNL
BADHDPS6	TAT AAA CTG GAC ACA NNS AAC CTG TGG TCA CTA TTA	
<b>KDPGA</b>	GCC GTT AGC TTC SNN CGG	PAEANG
BAKDPGA Der	TAT AAA CTG GAC CCG NNS GAA	
BAKDPGA Izq	CT AAC GGC TGG TCA CTA TTA	
<b>KDGA</b>	GAT GTT SNN AAT	IENI
BADKGA6	TAT AAA CTG GAC ATT NNS AAC ATC TGG TCA CTA TTA	
<b>FSA</b>	CTC CGC SNN CAC	VTAE
BAFSA	TAT AAA CTG GAC GTG NNS GCG GAG TGG TCA CTA TTA	
<b>FBA</b>	GGC GAT TTC TTC CGG GGT GTT TTT TTT GGC GCT CTG GCC GGC GGT AAC CAT SNN CGG	PNMVTAGQSA KKNTPEEIA
BADFBA Der	GAT AAA TAT AAA CTG GAC CCG NNS ATG GTT ACC GCC GG	
BADFBA Izq	AAC ACC CCG GAA GAA ATC GCC TGG TCA CTA TTA AAT GG	
<b>NAL</b>	GAG ATC SNN GCT	SGDL
BANAL6	TAT AAA CTG GAC AGC NNS GAT CTC TGG TCA CTA TTA	
<b>TALB</b>	CTG CCA SNN CGA	STWQ
BATALB	TAT AAA CTG GAC TCG NNS TGG CAG TGG TCA CTA TTA	

Para ensamblar las asas de las aldolasas clase I, los oligos se hibridaron y ligaron para así poderlos utilizar como kiloprimer en una reacción de PCR con (Figura No. 11).

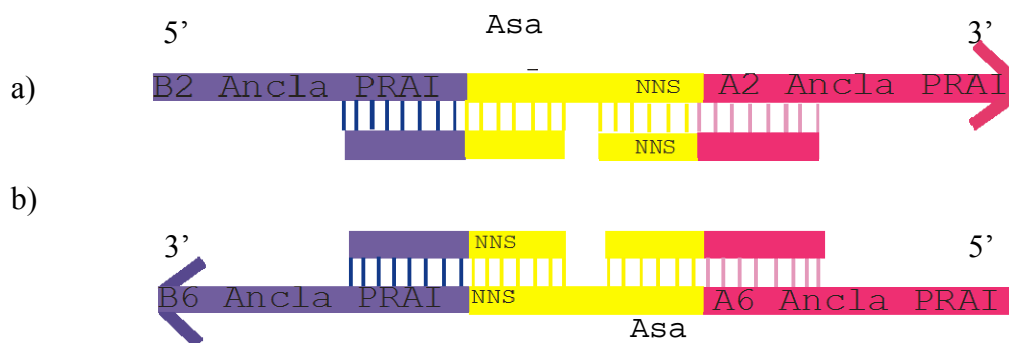


Figura No. 11 Representación de los oligonucleótidos que se sintetizaron para ensamblar las asas de las aldolasas. a) Ensamblaje del Asa 2, el kiloprimer será utilizado para hacer una PCR con megaprimer e incorporar las asas 2 a PRAI. b) Ensamblaje del asa 6 de de las aldolasas.

### Ensamblaje de kiloprimeres

La síntesis de oligonucleótidos se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología – UNAM. Posteriormente, los oligonucleótidos fueron purificados en un gel de acrilamida 15% Urea 7M.

Los oligonucleótidos purificados fueron quinados utilizando por cada 500 pmoles de oligonucleótido 10 unidades de Polinucleótido Quinasa (PNK, New England Biolabs)

durante 1 hora a 37°C, posteriormente se inactivó la enzima durante 20 minutos a 65°C y se precipitó el ADN con 1 – butanol y así poder llevar a cabo la ligación libre de quinasa.

Después de quinar los oligonucleótidos, se probaron dos formas para hibridarlos: una en un solo tubo y la otra por “lados”. Ambas hibridaciones tuvieron buenos resultados. La temperatura que se empleó para hibridarlos fue una rampa de 15°C a 30°C. El programa utilizado fue el siguiente:

20 C 30s	} 5X	Hibridación y ligación
25 C 30s		
30 C 30s		
25 C 30s		
20 C 30s		
15 C 45s		
15 C 10 min		
16 C Overnight		

Al finalizar el cuarto ciclo, se agregó la T4 ADN ligasa, incubando la reacción a 16° C durante toda la noche, posteriormente se analizaron las ligaciones en geles de poliacrilamida al 15%, 7 M Urea, teniendo como controles oligonucleótidos proporcionados por la Unidad de Síntesis del IBT. Cuando se verificó el peso molecular del *kiloprimer*, se procedió a hacer geles preparativos y purificar la banda de interés. Posteriormente se comprobó la extracción exitosa del oligonucleótido, y se realizaron las PCR's con megaprimer y así incorporar las asas al gene de PRAI.

### **Incorporación de las asas a PRAI: PCR con Megaprimer**

Con el fin de incorporar las secuencias al gene, la PCR con megaprimer se realizó en dos reacciones. La primera reacción para ensamblar el asa 2 tenía las siguientes condiciones: 1X Buffer de PCR Pfu, 2<sub>mM</sub> dNTPs, 20 pmol/μL Primer SalI, 20 pmol/μL Kiloprimer ensamblado, 30<sub>ng</sub> de ADN templado y 3 unidades de Pfu. El programa de PCR utilizado fue 95°C durante 5 minutos de desnaturalización inicial, después 5 ciclos de 95°C durante 30s, 45°C durante 30s y 72°C durante 30s, 20 ciclos de 95°C durante 30s, 55°C durante 30s y 72°C durante 1 minuto, para la extensión final, se utilizó una temperatura de 72°C por un lapso de 10 minutos. El producto se analizó en geles de agarosa al 1% y se procedió a purificar la banda del peso deseado mediante el kit *High Pure Extraction PCR Product* y el producto obtenido, se utilizó como primer en la segunda reacción. Para la segunda reacción

de PCR, el oligo de PRAI es HindIII y la temperatura de alineamiento en los primeros 5 ciclos disminuye a 40°C y en los últimos 20 a 50°C. (Figura No. 12)

Oligo 2602 HindIII 34nt

5' A TGA CAG TCC GAA GCT TCA GGA GGG GTG TTG ATG 3'

Oligo 2599 SalI 31nt

5' TAC GAA GTT ATG GTC GAC CCT CCT GCT GGC A 3'

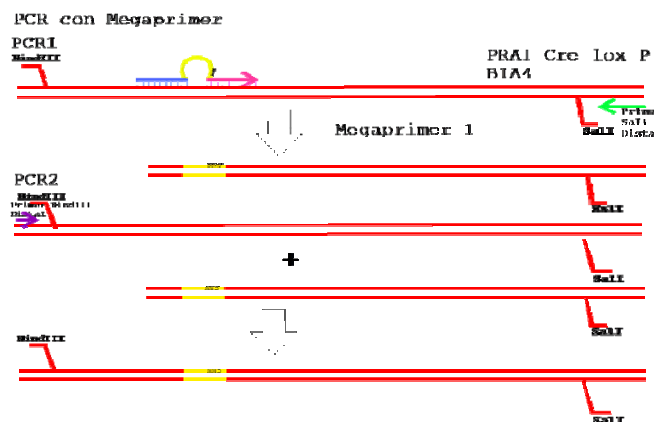
Oligo 2600 NheI 33nt

5' ATT GGT TTG CCG CTA GCT CAT TAA TAT GCG CG 3'

La primera reacción de PCR para ensamblar las asas 6 de las aldolasas tenían las mismas condiciones de reacción a excepción del oligo que amplifica desde la  $\beta$  plegada de PRAI, que es el primer HindIII, y las temperaturas de alineamiento durante el programa de PCR, las temperaturas fueron: durante 5 ciclos de 50°C y durante 20 ciclos de 60°C. Los productos fueron analizados en geles de agarosa al 1%, fueron purificados con el kit *High Pure Extraction PCR Product*, el ADN obtenido se utilizó como primer en la segunda reacción. La segunda reacción tiene las mismas temperaturas de alineamiento que la primera, y se utiliza el primer NheI de PRAI para llevar a cabo la amplificación.

El producto fue digerido con HindIII – SalI y HindIII – NheI, con el objetivo de clonar las mitades de PRAI por separado en pDAN5  $\Delta$ XhoI y así llevar a cabo la recombinación de las asas de las aldolasas, teniendo representadas la mayor parte de las variantes generadas por la mutación al azar introducida en la base del asa. Se extrajo ADN de plásmido y se enviaron a secuenciar 5 clonas por asa para verificar si el ensamblaje del asa fue correcto.

a)



b)

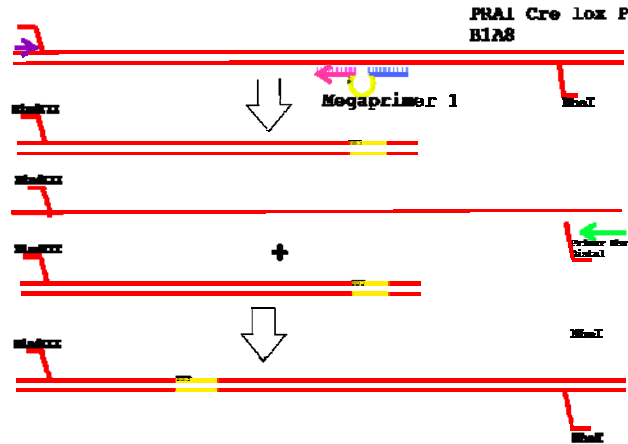


Figura No. 12 Estrategia para la incorporación de las dos asas a PRAI. a) Asa 2 y b) asa 6.

Con el fin de mejorar los resultados obtenidos con el banco anterior, es decir, eliminar la mayor cantidad de mutantes no deseadas, se procedió a realizar PCR's con megaprimer utilizando como templado clonas ya secuenciadas, y que no tuvieron mutaciones adicionales a la deseada; se utilizaron los oligonucleótidos que correspondían a la curita o band aid que contenía el sitio de mutagénesis a saturación, y los que flanqueaban el gen de PRAI (Figura No. 13).

Oligo 2601 XhoI 31nt

5' TAC GAA GTT ATC CTC GAG CGG TGG CCA TGT T 3'

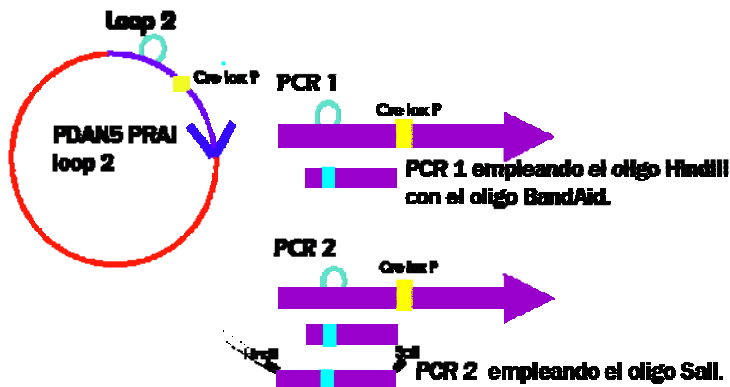
Oligo 2030 Distal1 PRAI 25 nt

5' GTG ATG GCT GCG GCA CCG TTG CAG T 3'

Oligo 2031 Distal2 PRAI 27nt

5' CTG CAT GGT AAT GAA GAA CAG CTG TAT 3'

a)



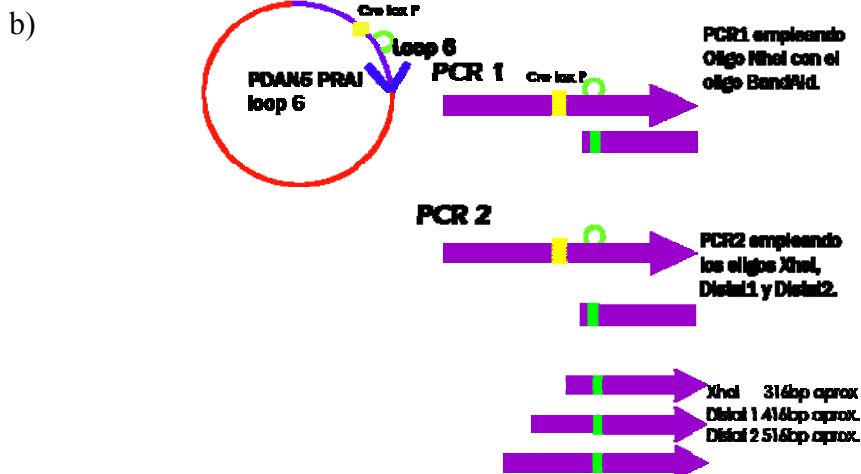


Figura No. 13 Mejoramiento del banco. A) Asa 2, se empleó el oligo Band Aid Derecha para volver a introducir la mutagénesis a saturación, B) Asa 6, se emplearon las Band Aids donde se encontraba la mutagénesis a saturación

### Generación de la variante PRAI V124K

Como control fue necesario construir una variante de PRAI con una Lisina colocada en una localización similar a la de las aldolasas. Se sintetizó un primer con la secuencia que contiene el cambio puntual de la Val 124 de PRAI por una Lisina. Las letras marcadas con negritas es donde se encuentra la mutación. La incorporación de la lisina fue llevada a cabo mediante PCR con megaprimer, de acuerdo con las condiciones descritas.

Oligo 604 PRAI V124K 36nt

5' GGC CGT TGT CCA GTT TAT ATT TAT CAA CGT GCT GA 3'

### Reacciones de restricción

#### Vector

El vector pDAN5  $\Delta$ XhoI se digirió con las enzimas HindIII y Sall para clonar la mitad  $\beta_1\alpha_4$ , y XhoI y NheI para  $\beta_5\alpha_8$ .

Se empleó por cada unidad de enzima 1  $\mu$ g de pDAN5  $\Delta$ XhoI, dichas reacciones fueron llevadas a cabo durante 12 horas a 37°C. Una vez transcurrido dicho lapso de tiempo, se procedió a hacer una purificación de ADN a partir de geles de agarosa. Posteriormente, se cuantificó el ADN recuperado.

La digestión con HindIII y Sall fue secuencial debido a la incompatibilidad de los buffers de reacción.

### **Restricción de productos de PCR**

La digestión se realizó después de concentrado el producto de PCR de las mitades. La mitad  $\beta_{1\alpha_4}$  se digirió de manera secuencial al igual que el vector. Las reacciones de restricción se realizaron a 37°C por 12 horas. Después de este tiempo, se procedió a limpiar el ADN digerido con el kit *High Pure PCR product* de Roche.

### **Reacciones de ligación**

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo utilizando una relación molar inserto – vector de 3:1. Las condiciones fueron las siguientes: 1X Buffer T4 ADN Ligasa (50 mM Tris – HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/mL BSA pH 7.5), vector digerido, inserto digerido, 400 u de T4 ADN Ligasa. La ligación se realizó a 16°C durante 12 horas. Luego, se precipitó la ligación con 1 – butanol mezclando por vortexeo, después se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos. La pastilla se lavó con etanol absoluto frío y se centrifugó a 14 000 rpm durante 3 minutos. Finalmente la pastilla se resuspendió en 20 µL de H<sub>2</sub>O milliQ estéril.

### **Electroporación**

Se emplearon células *E. coli* XL1 Blue para introducir el vector. Se probaron distintas concentraciones de ADN ligado para obtener el mayor número de electrotransformantes posibles. Se utilizó una concentración de 375 ng de ligación por cada celda de electroporación. Cada celda se sometió a un voltaje de 1.8 kV, las células se recuperaron inmediatamente en medio SOC (Sambrook *et al.*, 1989) y se incubaron durante 1 hora a 30°C a 250 rpm. Posteriormente se espatuló en medio LB con ampicilina (100 µg/mL) 1 µL de las células y se incubó a 30°C durante 16 horas, contándose las colonias obtenidas. El resto de las células fue guardado a 4°C para llevar a cabo los experimentos posteriores.

### **Búsqueda de clonas positivas**

Se realizaron reacciones de PCR de colonia para buscar las clonas que contuvieron el inserto, se picaron colonias y se resuspendió cada una en un tubo para PCR que contenía 20

$\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ estéril. Se agregaron los reactivos para PCR en las siguientes concentraciones: 1X Buffer de PCR, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM dNTP's, 20 pmol de cada primer, 2 unidades de Taq ADN Polimerasa, en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . El programa de PCR empleado fue 95°C durante 30 segundos de desnaturalización, 55°C de alineamiento de los primers, 72°C durante 1 minuto de extensión; y una extensión final de 10 minutos a 72°C, con 25 ciclos de amplificación. Estas reacciones fueron llevadas a cabo en iCycler de BioRad. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1%.

### **Obtención de ADN plasmídico**

Las clonas que tuvieron el inserto fueron crecidas en medio LB líquido con el antibiótico de selección. El ADN plasmídico se purificó a partir de dicho cultivo mediante el *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Roche. La metodología consiste en lisar las células en un medio alcalino, remover el RNA y los restos celulares. El ADN plasmídico presente en la fracción soluble se retiene al pasar por las columnas y finalmente este es el ADN que se recupera eluyéndolo con buffer bajo en sales.

### **Secuenciación de los plásmidos**

La secuenciación de los plásmidos / fagémidos con inserto fue realizada con el apoyo de la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología – UNAM.

### **Recombinación del banco de las mutantes**

#### **Obtención de fago helper R408**

Se obtuvo más fago helper R408 siguiendo el protocolo descrito de Alta multiplicidad de infección por Sambrook *et al.*, 1989. Este protocolo se utilizó con el fin de infectar células con el menor volumen de fagos posible, posteriormente, se tituló el número de fagos, obteniéndose aproximadamente  $2 \times 10^{11}$  fagos por mL.

#### **Obtención de ADN infectivo**

Las células resultantes de la electroporación fueron inoculadas, cada mitad por separado en 40 mL de medio líquido 2XYT suplementado con ampicilina, incubándose hasta obtener una O. D.  $600_{\text{nm}}$  de 0.5, es decir  $5 \times 10^8$  células por mL. Estas células se infectaron con una proporción de fago *helper*: célula de 20 a 1, esto es para aumentar la eficiencia de la infección; una vez que se infectó con el fago helper, se incubó el cultivo a 37°C sin

agitación durante 30 minutos. Ya transcurrido este lapso de tiempo, se incubó en agitación a 250 rpm a 30°C por 16 horas. Posteriormente se precipitaron los fagémidos y se titularon utilizando medio LB con antibiótico.

### **Recombinación *in vivo***

Después de haber titulado el número de fagémidos, se creció la cepa Cre<sup>+</sup> en 2mL de 2xYT en agitación a 37C hasta una OD<sub>600</sub> = 0.5, infectando posteriormente con el fago a recombinar con una MOI 200:1, una 100:1 por el fago de cada mitad. Se dejó reposar 30 minutos a 37°C para después agregar ampicilina. Después se incubó el cultivo a 30°C durante 8 horas. Transcurrido dicho tiempo se agregaron 38 mL más de medio y se dejó creciendo hasta obtener una una OD<sub>600</sub> = 0.5. Se rescataron los fagémidos agregando fago helper en una proporción 20 a 1, se dejó reposar 30 minutos a 37C y se incubó 12 horas a 30°C. Finalmente se recuperaron los fagos.

### **Construcción de Cepas de Selección**

Se diseñaron oligonucleótidos para hacer la remoción cromosomal del gene *aroD* que codifica para la enzima dehidroquinato dehidratasa. La estrategia a utilizar es la propuesta por Datsenko y Wanner (2000).

La estrategia es la siguiente, se diseñó un par de iniciadores: cada iniciador tiene una longitud de 59 y 58 nt, sentido y antisentido respectivamente. Cada uno tiene una región de 39 nt que hibrida ya sea con el inicio de transcripción o con el codón de paro del gene (negritas). Además se adicionaron 20 y 19 nt que hibridan con los sitios FRT.

Oligonucleótido 1082 para la remoción del gene *aroD* Fw 59nt

5' 3'  
**TGA CAG GCT GAC CGC GTG CAG AAA GGG TAA AAA ATG AAA ATT CCG**  
GGG ATC CGT CGA CC

Oligonucleótido 1083 para la deleción del gene *aroD* Rev 58nt

5' 3'  
**GCG GGG AGG GTG TTC CCG CCG AAA TAT TAT TGC TTA TGC TGT AGG**  
CTG GAG CTG CTT C

El templado es un plásmido que codifica para el gene que confiere la resistencia a apramicina, dicho gen está flanqueado por los sitios FRT. El producto de PCR se purificó,



por el método ya descrito, y posteriormente, se digiere con la enzima *DpnI*, con el fin de eliminar el ADN silvestre, es decir, el que no tiene los fragmentos que corresponden al gen a eliminar (Figura No.14a).

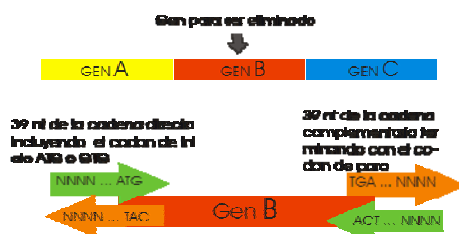
Una vez purificado el producto de PCR, se indujo la expresión de la  $\lambda$  Red recombinasa en las células receptoras, para facilitar la inserción del casete dentro del cromosoma, y se electroporó el producto de PCR, se seleccionaron las colonias que tuvieron la resistencia a apramicina y se procedió a hacer una reacción de PCR de colonia (Figura No. 14b). El tamaño esperado para la inserción del casete es de 1939 pb, así que cuando se obtuvo dicho producto, se prepararon células competentes para introducir un plásmido que exprese la FLP recombinasa, con el fin de eliminar la resistencia introducida (Figura No. 14c). Después de introducir el plásmido, se seleccionó por medio de sensibilidad a temperatura y se volvieron a hacer reacciones de PCR de colonia para verificar la pérdida de la resistencia, utilizando un programa de PCR que permitió el alineamiento de los oligonucleótidos: 95°C 10 minutos por un ciclo, 95°C 3 minutos, 65°C 3 minutos y 72°C 3 minutos, por 5 ciclos; y 95°C durante 1 minuto, 62°C 1 minuto y 72° 1 minuto, por 20 ciclos. Empleando los siguientes iniciadores:

Iniciador 1092 Verificación Delección aroD Fw 25nt  
 5' AAC CCC TTG AGA ATG AAT CAT TGG T 3'

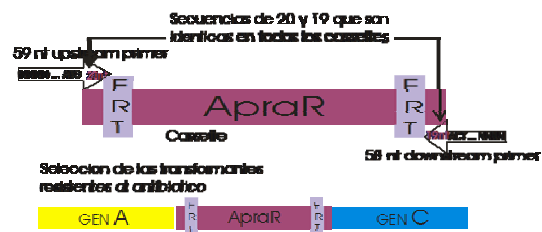
Iniciador 1093 Verificación Delección aroD Rev 25nt  
 5' CTT CCA GAA TAC CGC CGC CAG CGC C 3'

Finalmente se prepararon ensayos de complementación.

a)



b)



c)



Figura No. 14 Método descrito por Wanner y Datsenko (2000). a) Diseño de oligonucleótidos, las flechas coloreadas de verde corresponden a las regiones de los iniciadores que hibridan con el gen b) Introducción del Casete en JM101, y c) Eliminación de la Resistencia.

### Ensayos de complementación fenotípica

Los ensayos de complementación se llevaron a cabo en medio mínimo sólido y en medio líquido, ya que el medio LB es un medio rico y no permite evaluar si las mutantes generadas realizan la actividad que la cepa carece. Los cultivos se incubaron hasta tener una D. O. de 1.0 a 600<sub>nm</sub>, las células se lavaron 3 veces con PBS1X. Al final se resuspendieron de nuevo, se midió la D. O. 600<sub>nm</sub> y se hicieron diluciones hasta tener 100 células en la última dilución. Las células se incubaron a 30° C durante el tiempo que fue necesario para observar o no crecimiento.

### Expresión de la proteína recombinante

La expresión de la proteína PRAI V124K, se realizó con el vector pGEX 4T1 (Amersham), se subclonó la construcción, y se hicieron cinéticas de expresión. Dichos ensayos se realizaron en la cepa *E. coli* BL21 (Stratagene), induciendo la expresión con Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1mM.

## RESULTADOS

### Construcción de JM101 $\Delta$ aroD

En la actualidad se han generado cepas mutantes de actividades de las aldolasas dehidroquinato dehidratasa (*aroD*), dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*) y transaldolasa B (*talB*). La cepa AB2848, la cual es mutante de *aroD*, fue generada por mutagénesis química (Pittard y Wallace, 1966), mientras que las dos restantes AT997 ( $\Delta$ *dapA*), y LJ101 ( $\Delta$ *talB*:*talC*), fueron generadas por el método de Link *et al*, 1997. Uno de los objetivos primarios de este trabajo es la formación de bancos de millones de variantes y ser capaz de hacer una selección de éstas mediante el uso del sistema fagémido – plásmido ya mencionado, por lo que fue necesario construir una propia cepa de selección que contenga de modo nativo el factor F', el cual codifica para la síntesis del pili bacteriano necesario para la infección posterior con el fago.

La actividad que se planeó eliminar fue la de Dehidroquinato dehidratasa (*aroD*), ya que se encuentra involucrada en la biosíntesis de corismato (precursor de aminoácidos aromáticos), por lo que es fácil de verificar la auxotrofia.

La construcción de la cepa JM101  $\Delta$ aroD, que carece de la actividad DHQ, se realizó de acuerdo con el método descrito por Datsenko y Wanner (2000), el fenotipo de la cepa fue la ausencia de crecimiento en medio mínimo sin aminoácidos aromáticos, y posterior secuenciación de la “cicatriz” producida por la FLP recombinasa.

a)

b)

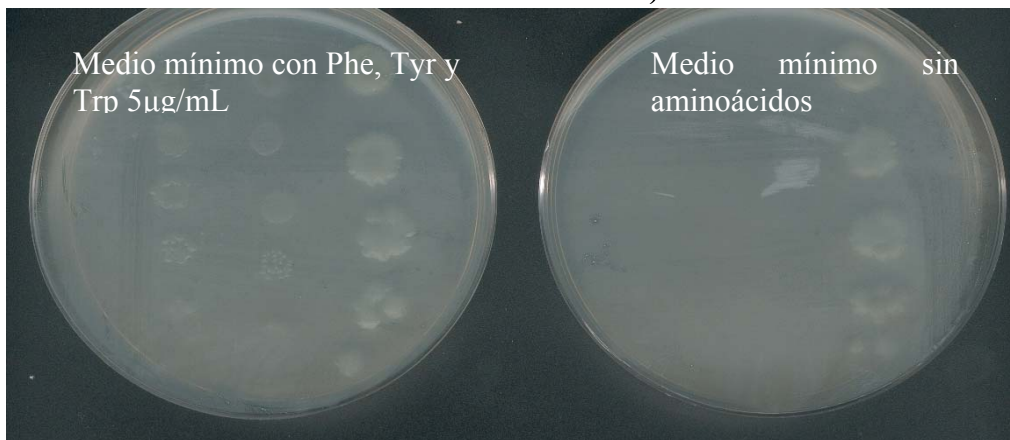


Figura No. 15 Ensayo de complementación fenotípica de la cepa JM101  $\Delta$ aroD. 15a) Medio mínimo con aminoácidos aromáticos. En el primer carril JM101  $\Delta$ aroD, en el segundo AB2848 ( $\Delta$ aroD) y en el último JM101wt. 15b) Medio mínimo sin aminoácidos

aromáticos. En el primer carril JM101  $\Delta$ aroD, en el segundo AB2848 ( $\Delta$ aroD) y en el último JM101wt. Crecimiento después de 30 horas.

Finalmente, como se observa en la Figura No. 15, se hicieron ensayos de complementación con el gene que codifica para Dehidroquinato dehidratasa, observándose crecimiento después de 22 horas de incubación a 30°C en medio mínimo sin aminoácidos aromáticos.

### **Mutación PRAI V124K**

La mutación puntual de PRAIV124K se produjo mediante la estrategia de PCR de megaprimer. Dicho cambio se verificó por secuenciación, posteriormente la mutante se sometió a pruebas de complementación fenotípica y de solubilidad (los resultados se muestran más adelante).

### **Ensamblaje de las asas de las Aldolasas Clase I**

Las Aldolasas Clase I fueron elegidas tomando en cuenta cuatro criterios: localización del sitio activo, catálisis dependiente de la formación de una base de Schiff, ausencia de cofactor y evitar la oligomerización del lado del sitio activo. Una vez elegidas y se sintetizaron los oligonucleótidos para llevar a cabo el ensamblaje de las asas.

Se ensamblaron 13 asas de las Aldolasas Clase I. Con objeto de darle flexibilidad a las construcciones se introdujo variabilidad; en el asa 6 en el segundo aminoácido del extremo aminoterminal de las asas, mientras que en el asa 2 se introdujo en el extremo carboxilo terminal.

En la Figura No. 16 se muestra el ensamblaje de los kiloprimeres del asa 2 y 6 empleados para la integración de los cambios a PRAI.

Una vez que se obtuvieron los kiloprimeres, se realizaron las reacciones de PCR utilizando como templado pDAN5 PRAI cre loxP. Los productos de 3 diferentes PCRs con asas se muestran en la Figura No. 17. Después de haber obtenido estos productos fueron purificados como se describió anteriormente, para después llevar a cabo la clonación de las construcciones.

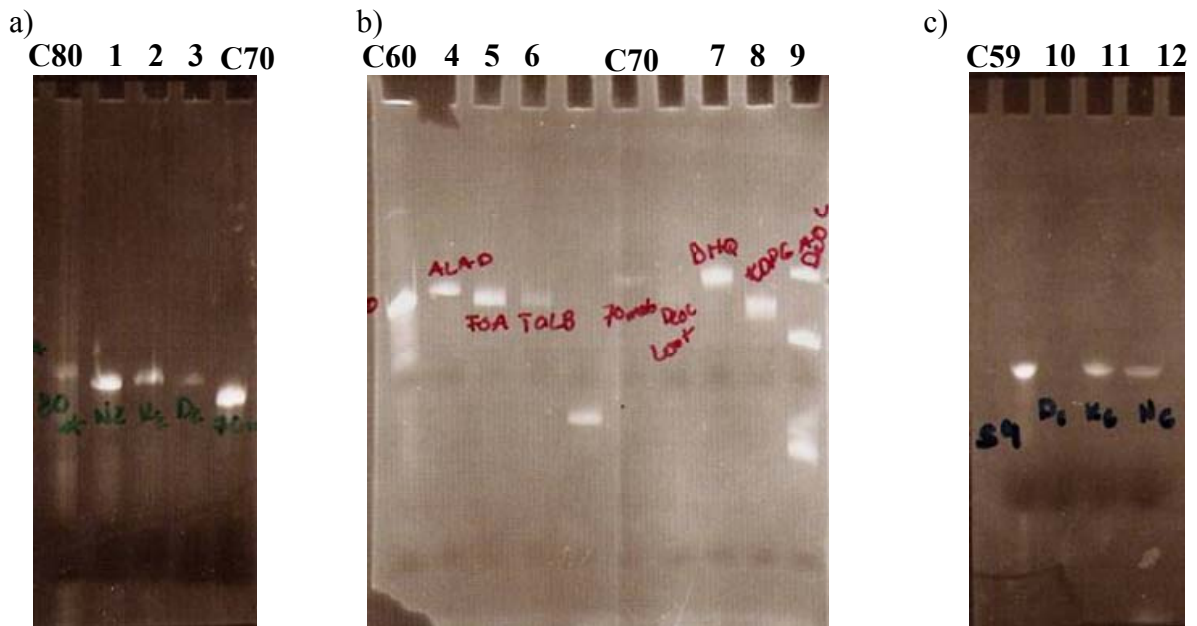


Figura No. 16. Ensamblaje de kiloprimers de aldolasas en geles desnaturizantes (acrilamida 15% Urea 7M). a) Control 80 nt, 1 NAL2 76nt, 2 KDGA2 76nt, 3 DHDPS2 76nt, Control 70 nt; b) Control 60nt, 4 ALAD 63nt, 5 FSA y 6 TALB 60nt, Control 70nt, 7 DHQ 72nt, 8 KDPGA 68nt, 9 DEOC 72nt; c) Control 59 nt, 10 DHDPS6 60nt, 11 KDGA6 60nt, 12 NAL6 60nt.

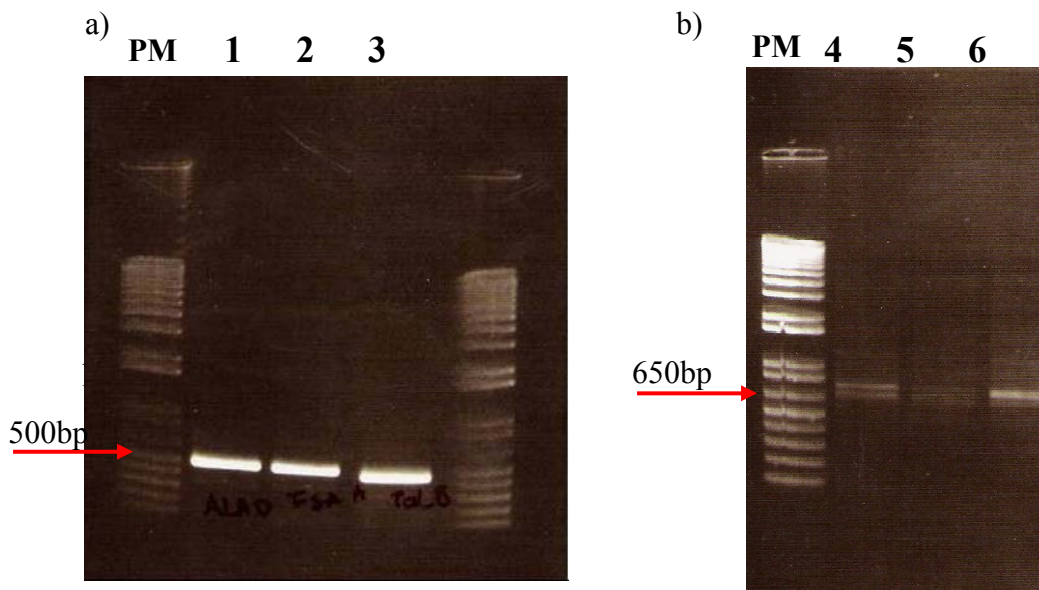


Figura No. 17 Reacciones de PCR con megaprimers en geles de agarosa al 1%. PCR1 a) PM Marcador de **Peso Molecular** 1Kb Plus (Invitrogen), 1 ALAD 515bp, 2 FSA 512nt, 3 TALB 512nt; PCR2 b) PM Marcador de **Peso Molecular** 1Kb Plus (Invitrogen), 4 ALAD 715 bp, 5 FSA 712nt, 6 TALB 712nt.

## Banco de Asas

Debido al número de variantes construidas, 13, sólo se secuenciaron 5 clonas de cada una de las construcciones. En el caso de las variantes de Dihydrodipicolinato sintasa, N-acetilneuraminato liasa, y la 2-ceto-deoxigluconato aldolasa se secuenciaron tanto las asas 2 y 6.

Se observó una eficiencia del 60 % de cada ensamblaje, a excepción del asa 6 de la N-acetilneuraminato liasa, Transaldolasa B, Fructosa 6 Fosfato aldolasa y la 2-ceto-deoxigluconato aldolasa, entre otras, donde se encontró una eficiencia del 80%.

Tabla No. 3 Estimación de Eficiencia del método de PCR con Megaprimer en el ensamblaje de las asas 2 y 6 de las Aldolasas Clase I.

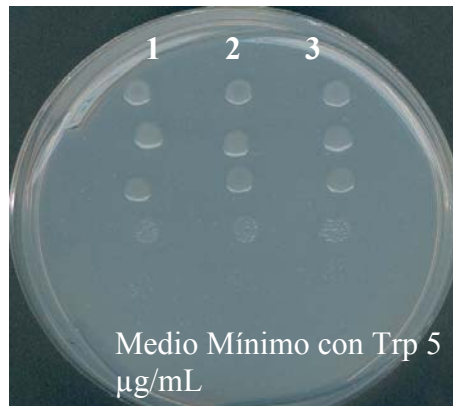
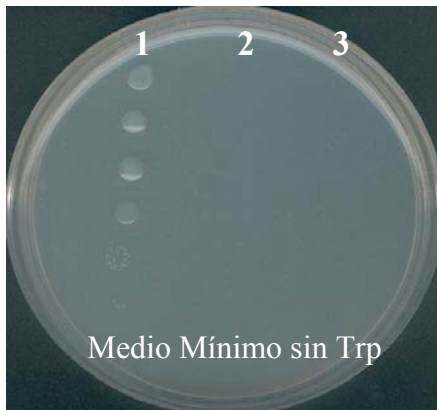
Enzima	Eficiencia	Mutaciones
2 – keto deoxigluconato aldolasa (KDGA)	60%	Asa 2 P, T, W.
Dihydrodipicolinato sintasa	60%	Asa 2 I, A, P.
N – acetilneuraminato liasa	60%	Asa 2 M, L, STOP.
2 – keto deoxigluconato aldolasa (KDGA)	60%	P, L, G.
2 - keto deoxifosfogluconato aldolasa	80%	T, S, Q, H.
Deshidratasa aminolevulínica	80%	V, D, W, Y
Dehidroquinato deshidratasa	80%	G. A, V, K
Deoxirribosa 5 fosfato aldolasa	80%	H, T, M, E.
Dihydrodipicolinato sintasa	60%	S, G, R
Fructosa 6 fosfato aldolasa	80%	T, R, K, D.
Fructosa 1,6 bifosfato aldolasa	60%	L,C,R
N – acetilneuraminato liasa	80%	G, H, Q, M
Transaldolasa B	80%	T, M, W, N

## Ensayos preliminares de complementación fenotípica

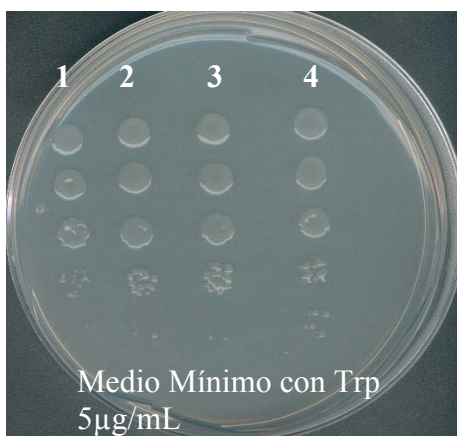
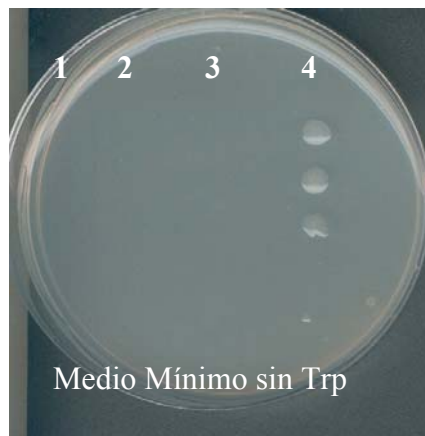
En este trabajo, se midió el cambio en la actividad enzimática debida a la inserción de las asas 2 y 6 de aldolasas Clase I en PRAI por medio de ensayos de complementación de actividad, tanto en la cepa auxótrofa de PRAI JM101  $\Delta trpF$  como en la cepa JM101  $\Delta aroD$ .

En primera instancia, se hizo un ensayo de complementación de actividad de la mutante sitio dirigida PRAI V124K para comprobar si las mutantes adicionadas con el asa tendrían o no actividad (Figura No. 18a). En el carril 1 se encuentra el control positivo que es el vóctor con la enzima PRAI Cre loxP (actividad silvestre), en el segundo se encuentra el control negativo que es PRAI mutada en la C7A, y D126A, y en el tercer carril está PRAI V124K. Posteriormente, las clonas de las asas 2 y 6 secuenciadas fueron sometidas a dichos ensayos (Figura No. 18b y 18c respectivamente). En la cepa JM101  $\Delta trpF$  se observó que el control positivo presentaba crecimiento después de 24 horas de incubación, mientras que PRAI V124K y con las asas 2 y 6 no presentaron crecimiento, aún cuando se llegaron a incubar dos semanas, esto indica que hay una pérdida total de actividad de la enzima. Por esta razón que se decidió expresar la mutante V124K para comprobar si la enzima se encuentra en forma soluble o en cuerpos de inclusión.

a)



b)



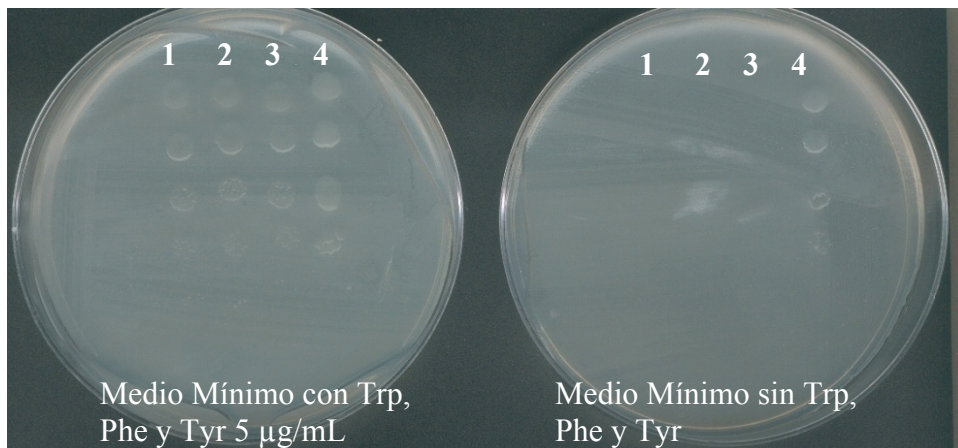
c)



Figura No. 18 Ensayos de complementación de actividad de las mutantes generadas en la cepa JM101  $\Delta trpF$ . a) Ensayo de PRAI V124K. Carril 1 Control positivo PRAI wt cre loxP, carril 2 PRAI C7A D124A, y carril 3 PRAIV124K. b) Asa 2. Carril 1 PRAI con asa 2 de Dihydrodipicolinato sintasa, en el carril 2 PRAI con asa 2 de N-acetilneuraminato liasa, en los últimos dos carriles está el control negativo y positivo, PRAI V124K y PRAI wt cre loxP respectivamente. c) Asa 6. Carril 1 PRAI con asa 6 de Deshidratasa aminolevulinica, carril 2 Fructosa 6 Fosfato Aldolasa, carril 3 2-ceto deoxifosfogluconato aldolasa, carril 4 N-acetilneuraminato liasa y carril 5 Transaldolasa B; mientras que los controles negativo y positivo se encuentran en el penúltimo y último carril (6 y 7) respectivamente.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los ensayos en la cepa JM101  $\Delta aroD$  fueron negativos. Los ensayos incluyeron a las construcciones de PRAI con las asas 2 (Dihydrodipicolinato sintasa y N-acetilneuraminato liasa) al igual que las asas 6 donde se encontraba la quimera de PRAI con el asa de la dehidroquinato deshidratasa. El control positivo tuvo crecimiento hasta después de 22 horas de incubación a 30°C (Figura No. 19).

a)





b)

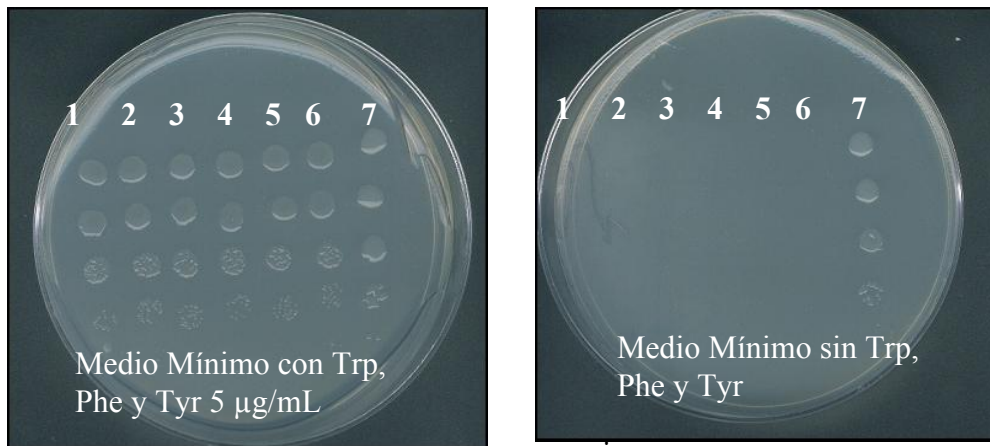


Figura No. 19 Ensayos de Complementación fenotípica de las variantes de PRAI con las asas 2 y 6 en la cepa JM101 $\Delta$ *aroD*. a) asa 2. Carril 1 PRAI con asa 2 de Dihydrodipicolinato sintasa, carril 2 PRAI con asa 2 de N-acetilneuraminato liasa; carril 3 y 4 controles negativo (PRAIV124K) y positivo (Dehidroquinato deshidratasa) respectivamente. b) asa 6. Carril 1 PRAI con asa de deshidratasa aminolevulínica, carril 2 con asa de dehidroquinato deshidratasa, carril 3 fructosa 6 fosfato aldolasa, carril 4 con asa de keto deoxifosfogluconato aldolasa, carril 5 con asa de transaldolasa B, mientras que en los dos últimos carriles (6 y 7) se encuentran el control negativo (PRAI V124K) y positivo, respectivamente.

### Expresión de la proteína PRAI V124K

La expresión de PRAIV124K fue llevada a cabo en un vector de expresión controlada por un promotor *tac*. La expresión fue inducida con 1mM de IPTG durante 8 horas, las células fueron lisadas por sonicación, el extracto fue analizado en un gel de acrilamida desnaturizante con SDS (PAGE – SDS) al 12% (Figura No. 20).

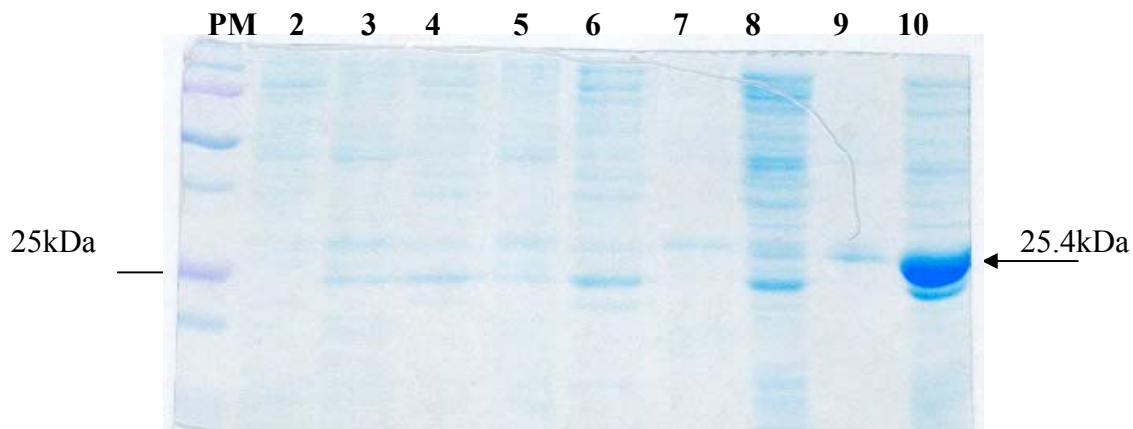


Figura No. 20 Expresión de PRAI V124K. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular; en el segundo carril JM101  $\Delta$ *trpF*, en los siguientes carriles (3 a 6) el

control negativo, que es pGEX vacío sin inducir e inducido en la fracción soluble y no soluble. En el carril 7 y 8 PRAI V124K sin y con inducir en la fracción no soluble, respectivamente; en el carril 9 y 10 la fracción soluble sin y con inducción de PRAI V124K.

En la Figura No. 20 se observa que la proteína se encuentra en la fracción soluble del lisado. Este resultado propone que en definitiva, se pierde actividad al realizar la mutación puntual PRAI V124K, pero que no se compromete su plegamiento. Sin embargo, está pendiente el comportamiento de las quimeras con las asas.

### Mejoramiento del banco de Asas

Conforme se explica en detalle en la discusión, consideramos posible mejorar la eficiencia de los bancos de asas, con el fin de eliminar elementos no deseados. El mejoramiento se dio en dos PCRs, cuyos productos digeridos se muestran a continuación en la Figura No. 21.

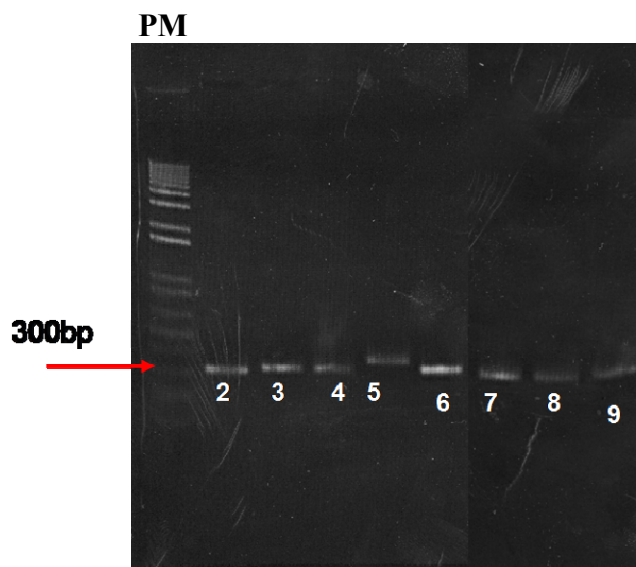


Figura No. 21 Productos de PCR del mejoramiento de los bancos. Carril 1, Marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen), 2 ALAD 310bp, 3 DHQ 319bp, 4 FSA 307bp, 5 FBPA 346bp, 6 KDGA6 307bp, 7 KDPGA 313bp, 8 NAL6 307bp, 9 TALB 309bp.

Después del mejoramiento del banco de asas 2 y 6, se obtuvo un pequeño banco de  $1 \times 10^4$  para el asa 2 y un banco de  $3.5 \times 10^5$  para el asa 6. El banco del asa 2 es relativamente pequeño, pero se esperan 32 variantes por cada una de las tres enzimas, Dihydrodipicolinato sintasa, 2-cetodeoxigluconato aldolasa y N-acetilneuraminato liasa. Fueron secuenciadas 10 clones de cada uno de los bancos (Tabla No. 4)

Tabla No. 4 Secuenciación inicial de los bancos mejorados de las asas 2 y 6.

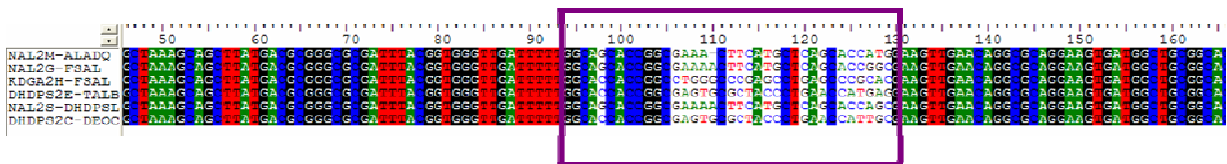
Enzima	Aminoácido	Codón
DHDPS2	L, S, I	TTG, AGC, ATC
KDGA2	H, D	CAC, GAC
NAL2	K, P	AAG, CCG

Enzima	Aminoácido	Codón
DEOC	ATG	M
DHQ	GGG	G
DHDPS	AAC	N
ALAD	AAC	N
FSA	ATG	M
KDGA	GGG	G
KDPGA	CAG	Q
NAL	GGC	G
TALB	GCC	A

### Recombinación del banco de asas

Los bancos fueron recombinados según el método descrito. El número esperado de variantes fue de  $3 \times 10^4$ , producto de la multiplicación de 96 por 320, número de mutantes del asa 2 y 6 respectivamente. Este número se superó recuperándose aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  fagémidos. Posteriormente se secuenciaron 10 clonas del banco (Figura No. 22), observándose dos secuencias donde existía una pérdida de la segunda mitad de la proteína justo después del sitio de recombinación y otra secuencia donde existía un codón de paro que truncaba toda la secuencia (estos datos no se muestran).

a)



b)

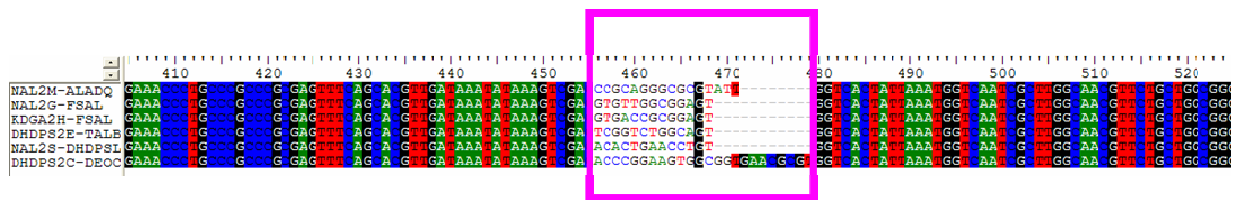


Figura No. 22 Alineamiento de las variantes recombinadas. El recuadro violeta muestra la secuencia del asa 2, mientras que el recuadro rosa muestra la secuencia del asa 6. (a y b, respectivamente).

El banco recombinado fue probado en las cepas de selección JM101  $\Delta trpF$  y JM101  $\Delta aroD$ ; sin embargo no se pudo observar crecimiento alguno. Este resultado era el esperado, ya que al realizar los ensayos preliminares en las cepas auxótrofas tampoco se observó crecimiento de las variantes con una sola asa.

### **Modelamiento de PRAI con las asas**

El modelamiento de PRAI con las asas fue realizado con el programa *Insight* II. En la Figura No. 23 se observa que las asas 6 más pequeñas como la de la Dihidrodipicolinato sintasa y Deshidratasa Aminolevulínica (de 4 y 6 aminoácidos respectivamente) podrían incorporarse mejor estructuralmente, aunque estructuras tan grandes como la de la Fructosa 1, 6 Bifosfato Aldolasa, de 19 aminoácidos, pudo resultar en una quimera bastante inestable, ya que la estructura original del asa 6 de PRAI es de 11 aminoácidos. Mientras que en el caso del asa 2 de PRAI, que consta de 8 de aminoácidos, la longitud de las asas 2 insertadas tiene un tamaño similar que es de 12 aminoácidos, las cuales probablemente se incorporaron a la estructura recipiente de una forma estable debido a la carga similar de las asas con el asa de PRAI. (Figura No. 23)

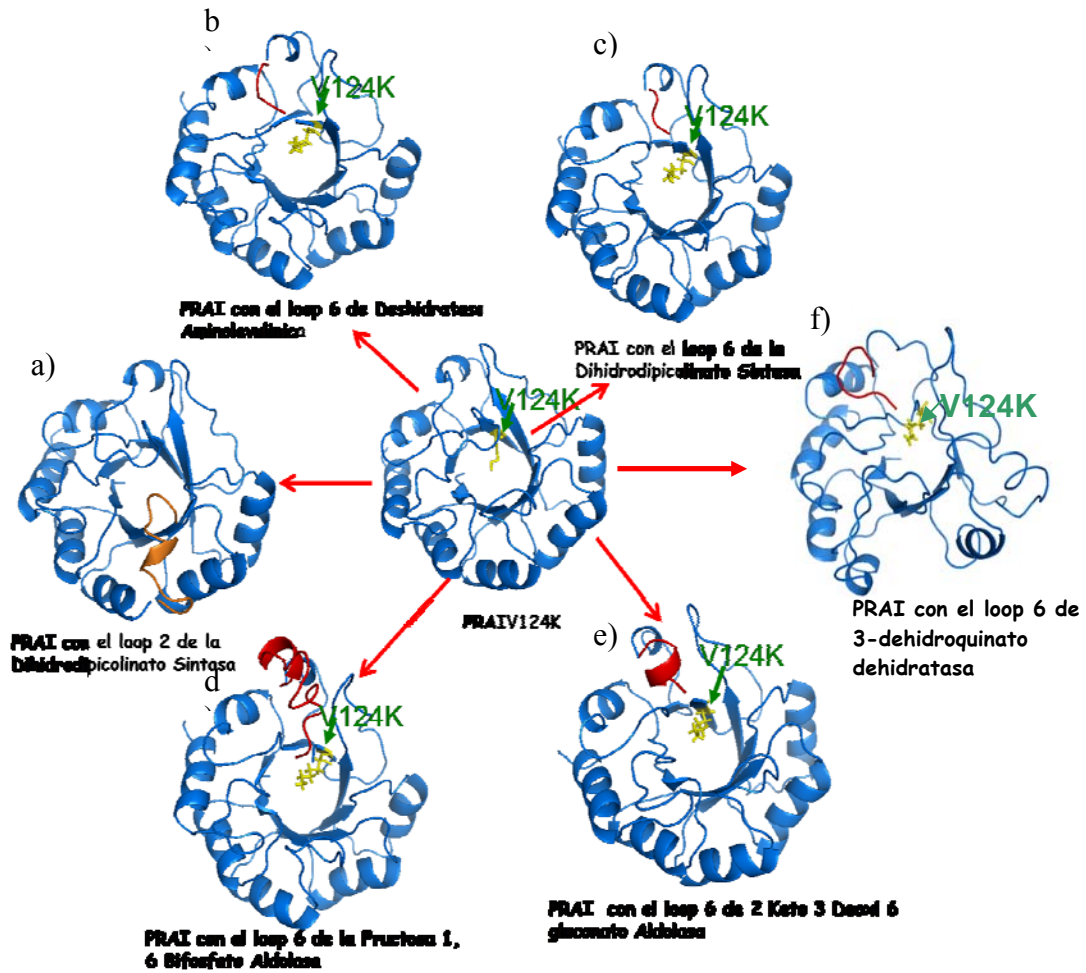


Figura No. 23 Modelamiento de PRAI con las asas de las Aldolasas Clase I: a) asa 2 de la Dihydrodipicolinato sintasa (coloreado de amarillo), b) asa 6 de Deshidratasa aminolevulinica, c) asa 6 de Dihydrodipicolinato sintasa, d) asa 6 de Fructosa 1, 6 bifosfato aldolasa, e) asa 6 de 2 keto deoxifosfogluconato aldolasa, y f) asa 6 de 3-dehidroquinato dehidratasa.

## DISCUSIÓN

La eficiencia de la evolución dirigida es altamente dependiente de la diversidad de las clonas esperadas. El tamaño de las bibliotecas generadas en este proyecto fue pequeño, es por este motivo que mejorarlas fue un paso necesario. El número esperado de variantes de cada una de las asas ensambladas era de 32 variantes, pero los resultados iniciales apuntaban a una serie de elementos no deseados como las mutaciones con codones de paro, repetición de codones y la aparición de secuencias silvestres. Si se obtenía una baja eficiencia en cada banco, se disminuiría considerablemente la posibilidad de encontrar una variante con las características deseadas, ya que posteriormente se recombinarían y la poca eficiencia de cada banco se multiplicaría.

El mejoramiento de los bancos se vio favorecido por el hecho de que la construcción de los bancos fue realizada mediante la técnica de ligación de oligos, la cual resultó ser bastante versátil, ya que fue reproducible en el ensamblaje de todos los kiloprimeres. A diferencia del método empleado por el resto de nuestro grupo, el kiloprimer generado es ADN de una sola cadena, atravesando por menos cuellos de botella que cuando se usa ADN de doble cadena, es decir, teniendo una pérdida menor del producto, y es posible emplear los oligonucleótidos correspondientes a las *Bandaid*s para el mejoramiento del banco, sin necesidad de sintetizar más oligos.

El método de recombinación descrito por Slabtttero *et al.* (2001) es un sistema bastante prometedor, que puede hacer posible la construcción de enormes bibliotecas de variantes, permitiendo explorar el mayor espacio de secuencia (Arnold, 2006). El propósito de utilizar esta poderosa herramienta fue el de poder generar variantes de PRAI que tuvieran ambas asas con las mutaciones correspondientes en el sitio de mutagénesis a saturación.

Aunque se secuenciaron pocas clonas y se pudo observar que se llevó a cabo la recombinación, el sistema no ha sido del todo bien estandarizado. Es necesario un detallado seguimiento para obtener los resultados deseados. De igual manera La recombinación *in vivo* puede tener problemas de reproducibilidad, incluyendo fácil contaminación y la

eficiencia de recombinación en algunos casos reportados corresponde al 50 – 80% total de la biblioteca (Otten y Quax, 2005).

Un elemento adicional incluido en las construcciones fue la sustitución de la Val124 por una Lys. Esta posición es la equivalente estructural a la lisina formadora de la base de Schiff en las aldolasas Clase I, y colocarla podría contribuir en la catálisis de aldolasa. Esta variante PRAIV124K resultó ser una variante inactiva para actividad de PRAI en los ensayos de complementación fenotípica, mientras que se observó en los ensayos de solubilidad que la proteína se encuentra en forma soluble. Esto parece indicar que se ha afectado la actividad de la enzima pero no se ha afectado la estabilidad de ésta. Después de haber sustituido *in silico* este residuo en la estructura de PRAI, se observó que no había formación de ningún puente salino con el D126 o con algún otro circundante, ni tampoco tenía interacción con la C7. Dado que ambos residuos (D126 y C7) están involucrados en la catálisis de PRAI; aunque no se realizaron los experimentos necesarios para validar esta hipótesis, es posible que se haya modificado la carga del sitio activo influyendo en la unión de la enzima con el sustrato (PRA).

En este proyecto se ha demostrado que con las translocación de asas de un grupo de enzimas pertenecientes a la superfamilia de las aldolasas Clase I no se produce un cambio en la actividad de PRAI; sin embargo, la expectativa para obtener variantes de PRAI con actividad de aldolasa era baja dado que el número de variantes recombinadas esperadas era de  $3 \times 10^4$ , y cada banco por separado era muy pequeño, reduciendo poco a poco la posibilidad de encontrar una variante con las características deseadas.

Un elemento de suma importancia para explicar el resultado negativo de la migración catalítica en este proyecto fue la falta de adición de mutaciones al azar o sitio dirigidas, es decir, realizar una mejor exploración del espacio de secuencia, lo cual pudiera haber significado en un cambio de actividad de esta proteína. Para realizar dicha exploración sería necesario hacer un análisis comparativo detallado enfocándose tanto a los sitios activos de las aldolasas como el de PRAI para poder acercarnos más al objetivo deseado, como ha sido sugerido por Morley y Kaslauskas (2005) y como se ha descrito para los anticuerpos catalíticos, y tal vez, elegir un plegamiento adecuado. Por el momento, en la comparación

del sitio activo de PRAI con la dehidroquinato dehidratasa (DHQ), para la cual se construyó un sistema de selección, se observa que PRAI con el asa de DHQ necesita tener otro residuo que cumpla con la función ácido – base y otro residuo que perturbe el pKa de la Lys que forma la base de Schiff, este residuo, tendría que haberse colocado, como se ha mencionado, en un microambiente hidrofóbico, y colocada en la proximidad de este aminoácido una Arg o una Lys.

Es importante remarcar que la migración catalítica no es un objetivo lejano a nuestras posibilidades, pero existen factores limitantes para lograr tan preciada meta, tales como la elección de enzimas que puedan resistir cambios en la estructura que estén catalíticamente relacionadas, y de algunos otros factores que aún no es posible de entender, dado que el conocimiento de estructura y mecanismos de reacción pueden ser realmente escasos, y dependiendo de la localización de las mutaciones (cerca o distantes del sitio activo).

Un estudio exitoso y destacado dentro de la evolución dirigida donde se logra cambiar la actividad de una enzima es el de Park *et al.* (2006), donde translocaron cuatro asas con residuos catalíticos de la  $\beta$  – lactamasa a la estructura de la glioxalasa II, ambas enzimas pertenecen a la misma superfamilia. Las modificaciones en la enzima resultaron en un aumento en la actividad evolucionada de  $\beta$  – lactamasa de cien veces. La relevancia de este trabajo reside en la movilización de estructuras secundarias proteicas con mutaciones al azar, proporcionando nuevas perspectivas para el diseño de nuevas actividades enzimáticas mediante la combinación de la evolución dirigida con el diseño racional, y a la vez ejemplificando los mecanismos pudieron ocurrir durante la evolución de estas proteínas.

En el caso de Terao *et al.* (2006) se introdujo un solo cambio puntual dentro de la estructura de la arilmalonato decarboxilasa con el fin de que catalizara reacciones de racemización. Ambas enzimas comparten la misma forma de intermediario, el cambio puntual realizado en la decarboxilasa fue un residuo que mantiene contacto con el intermediario conservado en las racemasas.



Al igual que este estudio, en PRAI se sustituyó el asa 6 por el epítopo FLAG, hallando que éste era un dominio estable capaz de ser reconocido por el anticuerpo monoclonal antiM2. El asa 6 está involucrada en la catálisis de la enzima, corroborando que se pierde por completo la actividad de PRAI sin afectar su estabilidad (Patrick y Blackburn, 2005).

Otros cambios de actividad entre dos enzimas cercanas es la de NAL – DHDPS (Joerger *et al.*, 2003), y HisA –TrpF (Leopoldseder *et al.*, 2004), involucrando cambios puntuales sitio dirigidos, con el elemento en común de la similitud del sustrato y la química de la reacción.

Los anticuerpos catalíticos con actividad de aldolasa son uno de los mejores ejemplos donde se ha logrado la migración catalítica. Las diferencias entre este proyecto y el realizado por Hoffman *et al.*, 1998, residieron en la generación de las variantes y la disposición de los residuos que rodean a la lisina catalítica. En la estructura cristalográfica del anticuerpo – aldolasa 33F12, uno de los anticuerpos catalíticos más exitosos, la lisina formadora de la base de Schiff se encuentra localizada en un pocket hidrofóbico en la base del sitio de unión del anticuerpo, con un pKa altamente perturbable, y de acuerdo con Kalstrom *et al.*, (2000), otras características fueron un pocket de unión con la configuración adecuada para interactuar con dos sustratos, la presencia de una base y la interacción del agua permitiendo la formación e hidólisis de los intermediarios imino.



## CONCLUSIONES

- Se consiguió un método reproducible para el reemplazo de asas, ejemplificado por las asas 2 y 6 de 10 Aldolasas Clase I, las cuales fueron incorporadas a PRAI, en combinación con elementos adicionales, una Lisina en la  $\beta_6$  y un sitio de mutagénesis a saturación. Esta combinación de modificaciones se orienta a facilitar la catálisis deseada y ajustar dichas asas a la estructura de esta proteína recipiente. El diseño de los oligonucleótidos empleados posibilitó el mejoramiento de los bancos construidos, economizando el número de pasos requerido.
- Las variantes generadas resultaron ser inactivas para la función de la enzima silvestre y para la función Dehidroquinato Dehidratasa, pero hay indicios de que la introducción de las asas con variación es tolerada desde el punto de vista estructural en una proporción significativa de las variantes.
- Para llevar a cabo el cambio de actividad de PRAI se requiere, al menos, de una mayor y mejor exploración del espacio de secuencia, tal vez aunada a una comparación minuciosa de ambos sitios activos, de la proteína receptora y de la enzima de interés.

## PERSPECTIVAS

Este trabajo es parte de un proyecto involucrado en la construcción de variantes de barriles TIM con el fin de realizar una búsqueda de nuevas actividades catalíticas mediante la translocación de estructuras secundarias. Es por ello que dado los resultados obtenidos en este trabajo, resulta imprescindible realizar cambios en la estrategia utilizada.

- Una de las metas es lograr obtener grandes bibliotecas donde se explore de manera más amplia el espacio de secuencia en las dos mitades de PRAI, combinando mutaciones al azar y sitio dirigidas.
- Además de los esquemas diversos de selección en auxótrofas, se podría introducir alguna técnica de búsqueda *in vitro* robotizada, para una actividad primordial (por ej. Formación de una base de Schiff) ya que esto podría permitir proceder de manera incremental y con mayor diversidad de sustratos.

- En este sentido, resultaría muy interesante utilizar el sistema de recombinación *in vivo* disponible en el laboratorio para así explorar de una forma exitosa el espacio de secuencia de nuestra proteína, mediante la selección de bibliotecas órdenes de magnitud más numerosas.

## Anexos

### Anexo 1

Medios de cultivo y complemento

#### 1. LB (1 litro)

- 10g triptona
- 10g NaCl
- 5g extracto de levadura
- Completar con agua miliQ a 1L

Para medio sólido

- 15g bacto agar

#### 2. 2XYT (1 litro)

- 16g triptona
- 10g NaCl
- 10g extracto de levadura
- Completar con agua miliQ a 1 L

Para medio suave (Top agar)

- 6g bacto agar

#### 3. M9 (1 litro)

- |                            |        |
|----------------------------|--------|
| • 10X Sales M9             | 100 mL |
| • 20% Glucosa              | 10 mL  |
| • 1M MgSO <sub>4</sub>     | 1 mL   |
| • 1M CaCl <sub>2</sub>     | 100 µL |
| • Tiamina – HCl (10mg/mL)  | 1 mL   |
| • 1000X aromix             | 1 mL   |
| • L – triptófano (10mg/mL) | 1 mL   |
| • Ampicilina (200mg/mL)    | 1 mL   |

Para medio sólido

- 15g de agar suave

#### 4. 1000X Aro – Mix (20 mililitros)

Ácido 4 – hidroxibenzoico	100 mg
Ácido 4 – aminobenzoico	100 mg
Ácido 2, 3 dihidrobenzoico	31 mg

Disolver en agua, agregar NaOH 1M hasta llegar a un pH (5.5), y esterilizar por filtración.

#### 5. SOC

- 20g triptona
- 5g extracto de levadura
- 10mL NaCl 1M
- 2.5mL KCl 1M

Completar con agua a 1L

Ajustar el pH a 7

#### 6. PBS 1X

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g	8mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g	1.5mM
KCl	0.2g	3mM
NaCl	8g	137mM

Ajustar el pH a 7.4.

#### 7. M9 10X

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30g	422.6mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	15g	172.2mM
KCl	2.5g	85.5mM
NH <sub>4</sub> Cl	5g	186.9 mM

## ABREVIATURAS

**ALAD:** Deshidratasa aminolevulínica

**DEOC:** 2-Deoxirribosa-5-fosfato aldolasa

**DHDPS:** Dihidrodipicolinato sintasa

**DHQ:** 3-Dehidroquinato deshidratasa Tipo I

**FSA:** Fructosa-6-fosfato aldolasa

**FBPA:** Fructosa 1, 6 bifosfato aldolasa Clase I

**FLP recombinasa:** Flippase recombinase

**FRT:** Sitio de recombinación de la recombinasa FLP

**KDPGA:** 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa

**KDGA:** 2-ceto-deoxigluconato aldolasa

**LB:** Medio Luria Bertani

**MM:** Medio Mínimo

**NAL:** N-acetilneuraminato liasa

**PRAI:** Fosforribosil Antranilato Isomerasa

**TALB:** Transaldolasa B

**pDAN5:** plásmido fagémido

**JM101 $\Delta$ aroD:** cepa de *E. coli* como sistema de selección

**JM101  $\Delta$ trpF:** cepa de *E. coli* como sistema de selección

**nt:** nucleótidos

**p.b.:** pares de base

**Kb:** kilobase

**Nm:** nanómetros

**Trp:** Triptofano

**Phe:** Fenilalanina

**Tyr:** Tirosina

## REFERENCIAS

- Allard, J., Grochulski, P., Sygusch, J., 2001. Covalent intermediate trapped in 2 – keto - 3 deoxy – 6 phosphogluconate (KDPG) aldolase structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 3679 – 3684.
- Arnold, F. H. 1998. Design by directed evolution. *Acc. Chem. Res.* 31: 125 – 131.
- Arnold, F. H. 2006. Fancy footwork in the space sequence shuffle. *Nature Biotechnology*, 24: 328 – 330.
- Bloom, J. D., Meyer, M. M., Meinhold, P., Otey, C. R., MacMillan, D., Arnold, F. H. 2005. Evolving strategies for enzyme engineering. *Current Opinion in Structural Biology*, 15:447 – 452.
- Cadwell, R. C., Joyce, G. F. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.*, 3: S136 – 40.
- Chen, R. 2001. Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *TRENDS in Biotechnology*, 19(1): 13 – 14.
- Creighton, T. E. 1992. Proteins: Structures and Molecular Properties. W. H. Freeman and Company, 2<sup>nd</sup> Edition, p.p.: 107 – 137.
- Copley, R. R., Bork, P. 2000. Homology among  $(\beta/\alpha)_8$ : implications for the evolution of metabolic pathways. *J. Mol. Biol.* 303: 627 – 640.
- Datsenko, K. A. y Wanner, B. L. 2000. One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K – 12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 6640 – 6645.
- de Villartaray, J - P., Fischer, A., Durandy, A. 2003. The mechanisms of immune diversification and their disorders. *Nature Reviews*, 3: 963 – 972.
- Fisch, I., Kontermann, R. E., Finner, R., Hartley, O., Soler – Gonzalez, A. S., Griffiths, A. D., Winter, G. 1996. A strategy of exon shuffling for making large peptide repertoires displayed on filamentous bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 7761 – 7766.
- Flajnik, M. F. 2002. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nature Reviews*, 2: 688 – 698.
- Fuentes – Gallego, P. 2002. Fragmentación del gene de la enzima fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI) de *E. coli* y regeneración de su actividad mediante la

complementación de fragmentos. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.

- Gerlt, J. A. 2000. New wine from old barrels. *Nature Structural Biology*, 7(3): 171 – 173.
- Gourley, D. G., Shrive, A. K., Polikarpov, I., Krell, T., Coggins, J. R., Hawkins, A. R., Isaacs, N. W., Sawyer, L. 1999. Two types of 3-dehidroquinase have distinct structures but catalize the same overall reaction. *Nature Structural Biology*, 6: 521 – 525.
- Heine, A., Luz, J. G., Wong, C. H., Wilson, I. A. 2004. Analysis of the Class I Aldolase binding site architecture based on the crystal structure of 2 – deoxyribose – 5 – phosphate aldolase at 0.99 Å. *J. Mol. Biol.*, 343: 1019 – 1034.
- Hibbert, E. G., Dalby, D. A. 2005. Directed evolution strategies for improved enzymatic performance. *Microbial Cell Factories*, 4: 29.
- Höcker, B., Jürgens, Wilmanns, M., Sterner, R. 2001. Stability, catalytic versatility and evolution of the ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> – barrel fold. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 376 – 381.
- Hoffman, T., Zhong, G., List, B., Shabat, D., Anderson, J., Gramatikova, S., Lerner, R. A., Barbas, C. F. 1998. Aldolase antibodies of remarkable scope. *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 2768 – 2779.
- Jia, J., Schörken, U., Lindqvist, Y., Sprenger, G.A. Schneider, G. 1997 Crystal structure of the reduced Schiff base intermediate complex of transaldolase B from *Escherichia coli*: mechanistic implications for class I aldolase. *Protein Science*, 6: 119 – 124.
- Kalstrom, A., Zhong, G., Rader, C., Larse, N. A., Heine, A., Fuller, R., List, B., Tanaka, F., Wilson, I. A., Barbas III, C. F., Lerner, R. A. 2000. Using antibody catalysis to study the outcome of multiple evolutionary trials of a chemical task. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 3878 – 3883.
- Lecomte, J. T. J., Vuletich, D. A., Lesk, A. M. 2005. Structural divergence and distant relationships in proteins: evolution of the globins. *Current Opinion in Structural Biology*, 15:290 – 301.



- Lee, W – H., Perles, L. A., Nagem, R. A. P., Shrive, A. K., Hawkins, A., Sawyer, L., Polikarpov, I. 2002. Comparison of different crystal forms of 3-dehydroquinase from *Salmonella typhi* and its implication for the enzyme activity. *Acta Crystallographica*, D58: 798 – 804.
- Leopoldseder, S., Claren, J., Jürgens, C., Sterner, R. 2004. Interconverting the catalytic activities of ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> – barrel enzymes from different metabolic pathways: sequence requirements and molecular analysis. *J. Mol. Biol.*, 337: 871 -879.
- Link, A. J., Phillips, D., Church, G. M. 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild – type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *Journal of Bacteriology*, 179:6228 – 6237.
- Mancera – Ramos, E. 2002. Recombinación *in vivo* de fragmentos de la enzima fosforribosil antranilato Isomerasa (PRAI). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Minshull, J., Stemmer, W. P. C. 1999. Protein evolution by molecular breeding. *Current Opinion in Molecular Biology*, 3: 284 – 290.
- Morley, K. L., Kaslauskas, R. J. 2005. Improving enzymes properties: when are closer mutations better: *TRENDS in Biotechnology*, 23: 231 -237.
- Nagano, N., Orengo, C. A., Thornton, J. M. 2002. One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* 321: 741 – 765.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2004. Principles of Biochemistry. W. H. Freeman and Company, 4<sup>th</sup> Edition, p. 190.
- Norledge, B. V., Lambeir, A. M., Abagyan, R. A., Rottman, A., Fernández, A. M., Filimonov, V. V., Peter, M. G., Wierenga, R. K. Modeling, Mutagenesis, and structural studies on the fully conserved phosphate binding loop (Loop 8) of Triose Phosphate Isomerase: toward a new substrate specificity. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 42: 383 – 389.
- Park, H - S., Nam, H - S., Lee, J – K., Noon, C – N., Mannervik, B., Benkovic, S. J., Kim, H – S. 2006. Design and Evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold. *Science*, 311: 535 - 538.

- Peimbert, M., y Segovia, L. 2003. Evolutionary engineering of a  $\beta$ -lactamase activity on a D-Ala D-Ala transpeptidase fold. *Protein Engineering*, 16: 27 - 35.
- Pittar, J., y Wallace J. B. 1966. Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 91: 1494 – 1508.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. 2001. *Inmunología*. Harcourt, 5a edición, pp 93 -100.
- Saab – Rincón, G., Mancera – Díaz, E., Montero – Morán, G., Sánchez, F., Soberón, X. 2005. Generation of variability *in vivo* recombination of halves of a  $(\beta/\alpha)_8$  barrel protein. *Biomolecular engineering*. 22: 113 – 120.
- Saab – Rincón, G., Rivelino – Juárez, V., Osuna, J., Sánchez, F., Soberón, X. 2001. Different strategies to recover activity of monomeric triose phosphate isomerase by directed evolution. *Protein Engineering*, 14: 149 – 155.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Samland, A. K., Sprenger, G. A. 2006. Microbial aldolases as C-C bonding enzymes-unknown treasures and new developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 253 – 264.
- Sblattero, D., Bradbury, A. 2000. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat. Biotechnol.*, 18:75 – 80.
- Schürmann, M., Sprenger, G. A. 2001. Fructose – 6 – phosphate aldolase is a novel class II aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *J. Biol. Chem.*, 276: 11055 – 11061.
- Soberón, X., Fuentes – Gallego, P., Saab – Rincón, G. 2004. In vivo fragment complementation of a  $(\beta/\alpha)_8$  barrel protein generation of variability by recombination. *FEBS letters*, 560: 167 – 172.
- Stemmer, W., Holland, B. 2003. Survival of the fittest molecule. *American Scientist*, 91: 526 – 533.
- Sterner, R., Höcker, B. 2005. Catalytic versatility, stability, and evolution of the  $(\beta\alpha)_8$  – barrel enzyme fold. *Chem. Rev.*, 105:4038 – 4055.

- Sterner, R., Kleeman, G. R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M., Kirschner, K. 1996. Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer. *Protein Science*, 5: 2000 – 2008.
- Terao, Y., Miyamoto, K., Ohta, H. 2006. Introduction of single mutation changes arylmalonate decarboxylase to racemase. *Chemical Communications*, 34: 3600 – 3602.
- Todd, A. E., Orengo, C. A., Thornton, J. M. 2001. Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *J. Mol. Biol.*, 307: 1113 -1143.
- Urfer, R., Kirchner, K. 1992. The importance of surface loops for stabilizing an eight fold  $\beta\alpha$  barrel protein. *Protein Science*, 1: 31 – 45.
- Wise, E. L., Rayment, I. 2004. Understanding the importance of protein structure to nature's routes for divergent evolution in TIM barrel enzymes. *Acc. Chem. Res.*, 37:149 – 158.
- Yuan, L., Kurek, I., English, J., Keenan, R. 2005. Laboratory – Directed Protein Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69:373 – 392.
- Zahra, D. G., Vancov, T., Dunn, J. M., Hawkins, N. J., Ward, R. L. 1999. Selectable in – vivo recombination to increase antibody library size – an improved phage display system. *Gene*, 227: 49 – 54.
- Zhu, X., Tanaka, F., Hu, Y., Heine, A., Fuller, R., Zhong, G., Olson, A. J., Lerner, R., Barbas III, C. F., Wilson, I. A. 2004. The origin of enantioselectivity in aldolase antibodies: crystal structure, site directed mutagenesis, and computational analysis. *J. Mol. Biol.* 343: 1269 – 1280.