



KARINA VERDEL ARANDA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

CINÉTICA ENZIMÁTICA DE FOSFORRIBOSIL ANTRANILATO ISOMERASAS (PRAI) OBTENIDAS POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA

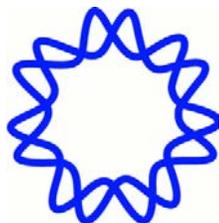
T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

IBQ. Karina Verdel Aranda

DIRECTOR DE TESIS: DR. F. XAVIER SOBERÓN MAINERO

CUERNAVACA, MORELOS, JULIO DE 2009





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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

- Universidad Nacional Autónoma de México
- Instituto de Biotecnología
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- Dr. Xavier Soberón Mainero
- Comité tutorial: Dr. Edmundo Castillo, Dr. Francisco Barona Gómez, Dra. Rosario Muñoz Clares
- Jurado de examen: Dr. Agustín López-Munguía Canales, Dra. Georgina Garza Ramos, Dra. Marcela Ayala Aceves, Dr. Rafael Vázquez Duhalt
- Grupo Soberón-Morett
- Grupo Barona
- A mis amigos de siempre
- A toda mi familia especialmente a mis padres y hermanos por todo, los quiero.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS	2
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Evolución dirigida	6
1.2 Barriles TIM o $(\beta/\alpha)_8$	8
1.2.1 Función	9
1.2.2 Estructura	10
1.3 Historia evolutiva de los Barriles $(\beta\alpha)_8$	11
1.4 Fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI o TrpF).....	13
1.5 Fosforribosil isomerasa A (PriA)	18
1.6 Ensayos enzimáticos acoplados.....	20
1.7 Antranilato fosforribosil transferasa (AnPRT o TrpD)	21
1.8 Indol glicerol fosfato sintasa (IGPS o TrpC).....	22
1.9 La caracterización enzimática como herramienta para comprender los procesos de evolución natural y dirigida.....	24
2 ANTECEDENTES	26
2.1 Antecedentes en nuestro laboratorio.....	26
2.2 Antecedentes del ensayo enzimático de PRAI	28
2.3 Mutantes PRAI obtenidas por sustitución de asas provenientes de PriA.....	32
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO	34
Objetivos particulares.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1 Clonación y Purificación de ssTrpD.....	35
3.2 Prueba de cepas para expresión de TrpD.....	35
3.3 Clonación y expresión de ecPRAI y PRAIs obtenidas por evolución dirigida	37
3.4 Clonación y expresión de ecIGPS	38
3.5 Purificación de ssAnPRT, ecPRAIwt y ecIGPS yAnPRT y tmIGPS y mutantes a ensayar	38
3.6 Cuantificación de proteínas purificadas	42
3.7 Ensayo enzimático acoplado (ssAnPRT-PRAI-IGPS).....	42
3.7.1 Ensayo fluorimétrico	42
3.7.2 Ensayo espectrofotométrico	44
3.8 Actividades específicas de enzimas quiméricas	44
3.9 Cinéticas de crecimiento de las enzimas caracterizadas.....	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1 Clonación y expresión de las proteínas	46
4.2 Purificación de las proteínas.....	52
4.3 Ensayo enzimático acoplado (ssAnPRT-ecPRAI) en fluorímetro	55
4.4 Ensayo enzimático acoplado (ssAnPRT-ecPRAI-ecIGPS) en espetrofotómetro.....	63
4.5 Caracterización cinética de mutantes	65

4.6 Actividades específicas de enzimas quiméricas	68
5. CONCLUSIONES.....	71
REFERENCIAS	73
ANEXO I Plásmidos y Cepas.....	77
ANEXO II Cursos temporales de reacción de PRAI silvestre y mutantes.....	79
ANEXO III Medios de cultivo y buffers.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de evolución <i>in vitro</i> o evolución dirigida	7
Figura 2. Clasificación de las enzimas de acuerdo Comisión de Enzimas	9
Figura 3. Esquema de la estructura de un barril TIM	11
Figura 4. Posible ruta evolutiva propuesta para los barriles TIM	13
Figura 5. Esquema de la ruta de biosíntesis del triptófano	15
Figura 6. Estructura de PRAI monofuncional de <i>E. coli</i>	16
Figura 7. Mecanismo de reacción propuesto para PRAI	17
Figura 8. Reacciones enzimáticas de PriA (TrpF y HisA)	19
Figura 9. Estructura tridimensional PriA de <i>Streptomyces coelicolor</i> (PDB 2vep)	19
Figura 10. Reacción catalizada por AnPRT	20
Figura 11. Reacción catalizada por IGPS o TrpC y estructura tridimensional de IGPS de <i>T. maritima</i> (entrada PDB 1I4N)	23
Figura 12. Reacción acoplada AnPRT-PRAI-IGPS	29
Figura 13. Esquema del proceso seguido para la corrección de mutaciones de ssTrpD	47
Figura 14. Westernblot de ssTrpD identificada con un Anti6XHisTag	49
Figura 15. Espectro de emisión de AA a una longitud de onda de excitación de 310 nm	55
Figura 16. Progreso temporal de la reacción de ssTrpD y yAnPRT	55
Figura 17. Curva patrón utilizada para la obtención de concentraciones de PRA sintetizado enzimáticamente por ssTrpD y yAnPRT	56
Figura 18. Curvas temporales la reacción de yAnPRT usando diferentes concentraciones de dicha enzima	57
Figura 19. Progreso temporal de la reacción de tmIGPS	60
Figura 20. Representación gráfica de la producción enzimática de PRA y su hidrólisis sin exceso de PRPP	63
Figura 21. Representación del producto intermediario P (CdRP, en el caso de PRAI) y el producto final Q (InGP en el caso de IGPS) como función del tiempo. (Rudolph <i>et al.</i> , 1979)	64
Figura 22. A) Curvas de crecimiento de la cepa JM101 Δ trpF en medio M9 líquido transformadas con wtPRAI, M5, M4, y PriA B) Curvas de crecimiento en LB/AMP.	66
Figura 23. A) Gel SDS-PAGE con los extractos totales de las diferentes mutantes ensayadas para la obtención de sus actividades específicas B) Curvas de actividad de las mutantes seleccionadas seguidas por desaparición de fluorescencia debida al consumo de PRA	70

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla 1. Parámetros cinéticos de PRAI de <i>E. coli</i> y <i>T. maritima</i> y PriA (actividad TrpF) <i>Streptomyces coelicolor</i>	18
Tabla 2. Datos cinéticos del estado estacionario de AnPRT de diferentes microorganismos	22
Tabla 3. Parámetros cinéticos del estado estacionario de tmIGPS y ecIGPS	24
Tabla 4. Condiciones de temperatura y concentración de IPTG utilizadas en la expresión de proteína AnPRT del <i>Sulfolobus solfataricus</i>	37
Tabla 5. Condiciones de expresión empleados para las diferentes proteínas utilizadas en el ensayo PRAI	50
Tabla 6. Condiciones de purificación de las diferentes proteínas empleadas en el ensayo de actividad TrpF y geles SDS-PAGE	53
Tabla 7. Parámetros cinéticos de PRIA y PriA obtenidos mediante ajuste de datos a dos modelos diferentes (Michaelis-Menten y Hill)	60
Tabla 8. Parámetros catalíticos de ecPRAI y scPriA silvestres obtenidos en tres experimentos independientes	61
Tabla 9. Parámetros catalíticos de mutantes 4 y 5 obtenidos en tres experimentos independientes	66
Tabla 10. Residuos que forman las bisagras de las mutantes de PRAI con loop 1 de PriA en la posición 6	68
Tabla 11. Descripción de las mutantes ensayadas mediante actividad específica de los extractos totales	70
Gráficas 1-4. Curvas de saturación de ecPRAI y parámetros obtenidos mediante un ajuste no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten (1,3,5) y la ecuación de Hill (2, 4)	59
Gráficas 5-6. Curvas de saturación de ecTrpF (6,8) y scPriA (7,9) (modelos silvestres) realizadas por triplicado y ajustadas al modelo de Michaelis-Menten	61
Gráficas 7-8. Curvas de saturación de Mutante 4 y 5 por triplicado ajustadas al modelo no lineal de Michaelis-Menten.	65

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Evolución dirigida

Las enzimas han evolucionado naturalmente para catalizar una sorprendente cantidad de reacciones. Dada esta diversidad, se ha planteado la posibilidad de rediseñar proteínas que puedan ser empleadas en una gran número de aplicaciones como la creación de biosensores, diagnósticos, terapias, biorremediación y otras aplicaciones aún inimaginables.

Avances recientes en la tecnología específicamente en la biología molecular con el uso de DNA recombinante han facilitado los intentos de la ciencia para mimetizar el proceso natural de la evolución molecular y con la ayuda de métodos computacionales obtener proteínas que puedan unir varios compuestos o que puedan catalizar diversas reacciones. Del mismo modo, estos avances han ayudado al establecimiento de nuevos conocimientos de la relación estructura-función de las proteínas (Matsumura *et al.*, 2006).

La evolución dirigida es un término que incorpora los principios básicos de evolución en las estrategias experimentales. Dicho concepto se emplea generalmente para describir varias técnicas empleadas en la generación de proteínas mutadas (variantes) y selección de la función deseada, y se ha convertido en una estrategia muy popular para comprobar o alterar las propiedades biofísicas de las proteínas e incluso para generar proteínas con funciones nuevas. La evolución *in vitro*, como también es llamada, se basa en ciclos consecutivos de diversificación y selección en pequeña escala bajo condiciones de laboratorio. Para lograrlo, se localiza el gen que codifica para la proteína de interés, se muta aleatoriamente para generar una librería de genes mutados, cuyos productos proteínicos son analizados con base en la actividad de interés. Las proteínas que exhiben las propiedades deseadas se seleccionan, se amplifican los genes que las codifican y se usan para los ciclos consecutivos de mutagénesis, y selección (Fig. 1).

Sin embargo, la evolución dirigida difiere de la evolución natural en ciertos aspectos. Por ejemplo, los mecanismos evolutivos en la naturaleza trabajan para asegurar la adaptabilidad de las especies frente a los cambios en el medio ambiente, es decir, ocurre bajo múltiples y variadas formas de presión selectiva y no funciona en una dirección lineal, en el sentido de

que ocurre espontáneamente durante la reproducción y supervivencia de los organismos. Esto no es así a nivel de laboratorio, donde se tiene un objetivo definido y la totalidad del proceso es controlado por el experimentador mediante la presión de selección para funciones predeterminadas. Además con evolución dirigida se pueden obtener funciones “no naturales” de uso práctico a través del diseño de esquemas de selección apropiados (Arnold, 1998)

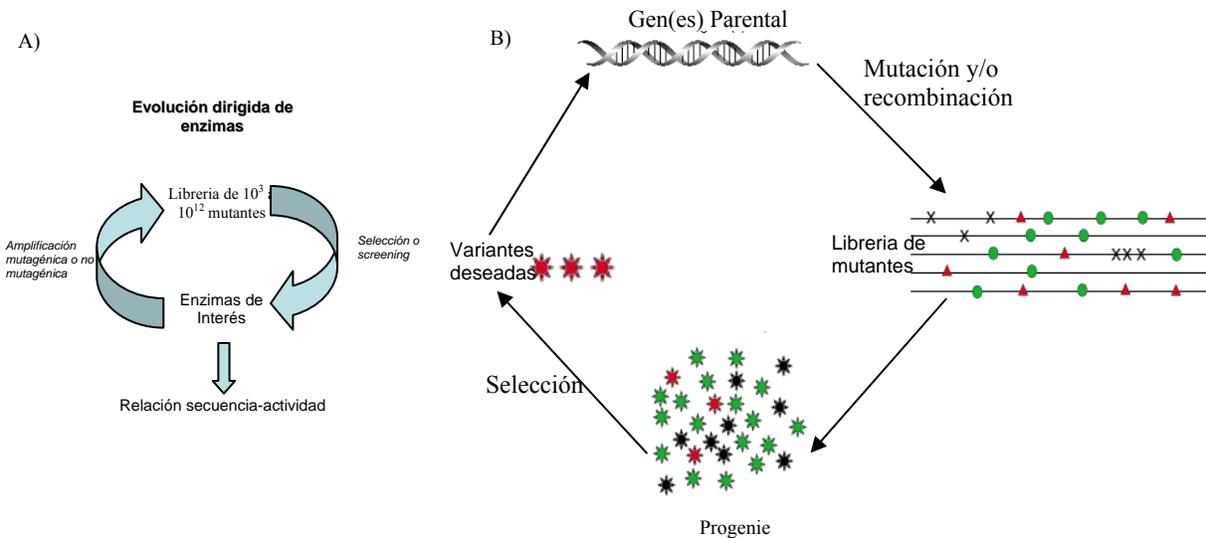


Figura 1. A) Esquema del proceso de evolución *in vitro* o evolución dirigida (Jestin *et al.*, 2005). B) Variantes individuales en una librería de mutantes (derecha) difieren de los genes parentales dado que contienen mutaciones que son funcionalmente neutrales (círculos verdes), deletereas (X) o benéficas (triángulo rojo). Los genes mutados se seleccionan por la función de interés, dichas variantes son aisladas (estrellas rojas) y se usan como genes parentales para los ciclos subsiguientes de evolución (Chatterjee *et al.*, 2006).

En el laboratorio la diversidad genética puede ser introducida a través de mutaciones puntuales, recombinación o la combinación de ambos métodos. Las estrategias computacionales pueden combinar el diseño racional con la evolución dirigida, incorporando elementos estructurales de las proteínas así como de estabilidad de la misma en el diseño de una librería de genes.

La evolución dirigida tiene como ventaja que puede adaptar un biocatalizador (enzima) a condiciones impuestas a través del diseño e implementación de la selección génica, así como la evaluación de la función deseada sin requerir conocimiento extenso *a priori* de la relación gen-función. (Chatterjee *et al.*, 2006). Sin embargo, existen pocos experimentos que han sido exitosos en el intento de recapitular completamente la evolución natural, sugiriendo que existen principios evolutivos que no han sido explotados en su totalidad. La

evolución natural trabaja reciclando estructuras y motivos catalíticos, con alteraciones sutiles para generar nuevas funciones. Con el conocimiento de las reglas que sigue el proceso evolutivo se puede trabajar con pasos más firmes hacia el diseño de enzimas eficientes que puedan catalizar una amplia variedad de reacciones, incluso, aquellas no vistas aún en la naturaleza (Glasner *et al.*, 2007).

La mayoría de las enzimas presentan actividad óptima en solución acuosa y pH neutro y por tanto necesitan ser modificadas para su uso en la industria biotecnológica. En 1993 Arnold y colaboradores reportaron que mediante el uso de la evolución dirigida se obtuvo actividad de la proteasa subtilisina E en co-solventes orgánicos. Actualmente la evolución *in vitro* se ha aplicado principalmente en la investigación y desarrollo de tecnología de DNA recombinante, biocatálisis, ingeniería de vías metabólicas, en el área farmacéutica y de agricultura. Asimismo, es una herramienta importante en el estudio de la evolución y relación entre estructura-función de proteínas. La evolución *in vitro* es también popular para acelerar la adaptación de las propiedades de alguna proteína (estabilidad, especificidad o afinidad) en condiciones extremas, tales como altas temperaturas y solventes orgánicos. (Matsuura *et al.*, 2006). Por medio de la evolución dirigida también se ha dado lugar a la alteración de la especificidad y actividad de enzimas, aumentando las interacciones intramoleculares, modificando las interacciones proteína/proteína, alterando las rutas metabólicas, etc. (Yuan & Kurek, 2005).

Uno de los modelos más utilizados para llevar a cabo estudios de evolución dirigida son los barriles TIM, dadas sus características funcionales y estructurales; por tal motivo se describirán más a detalle en las siguientes páginas.

1.2 Barriles TIM o $(\beta/\alpha)_8$

La primera proteína en la cual se encontró un dominio de ocho hebras que daban la apariencia de un barril $\beta\alpha$ fue la triosa fosfato isomerasa por lo cual se adoptó el nombre de barril TIM o barril $(\beta/\alpha)_8$ (Banner *et al.*, 1975).

1.2.1 Función

El plegamiento del barril (β/α)₈ es la estructura más común encontrada en el *Protein Data Bank* (PDB), siendo por lo menos el 10% de todas las estructuras enzimáticas reportadas. Al menos 15 familias enzimáticas distintas usan este plegamiento para generar un sitio activo con la geometría apropiada para la catálisis (Wierenga *et al.*, 2001), abarcando cinco de las seis funciones catalíticas establecidas por la Comisión de Enzimas (EC) (Fig. 2) y participando en un gran número de vías metabólicas (Sterner *et al.*, 2005).

- Oxidorreductasas
- Transferasas
- Liasas
- Hidroxilasas
- Isomerasas

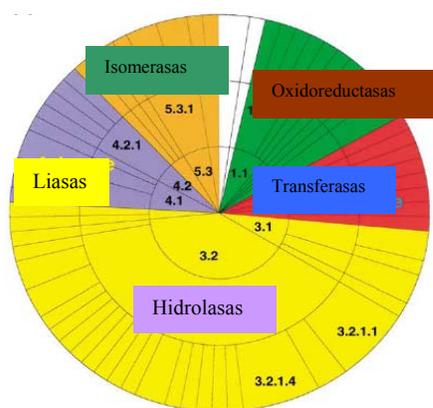


Figura 2. Clasificación de las enzimas de acuerdo a la reacción que catalizan según la Comisión de Enzimas.

Algunos ejemplos típicos con este plegamiento incluyen al biocatalizador perfecto; la triosa fosfato isomerasa (TIM), una enzima extremadamente proficiente [$(k_{cat}/K_M)/k_{non} = 2 \times 10^{23} \text{ M}^{-1}$]; orotidina-5-monofosfato decarboxilasa (OMP decarboxilasa) y la proteína más abundante en la tierra, la ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) (Patrick *et al.*, 2005).

De las más de 60 reacciones distintas que catalizan los barriles TIM, el 85% están involucradas en metabolismo energético, metabolismo de macromoléculas o metabolismo de pequeñas moléculas. Una gran proporción de barriles (β/α)₈ requieren la presencia de cofactores orgánicos tales como FMN, NADP o PLP, y cerca de la mitad de ellos usan iones metálicos divalentes para su catálisis (Nagano *et al.*, 2002).

Dicho plegamiento provee el andamiaje para diversas funciones enzimáticas, pero también se ha encontrado en proteínas que no presentan actividad enzimática, por lo que representa una materia prima muy explotada en la ingeniería de proteínas para explorar la función y estructura de las enzimas, mediante diseño racional o por mutagénesis aleatoria que permite la modificación de su función. Asimismo, los barriles TIM presentan gran interés ya que tienen una historia evolutiva muy interesante pues muestran una baja identidad de secuencia entre sí. Este hecho, combinado con argumentos geométricos concernientes a la estructura de barril, sugiere que estas proteínas están relacionadas por evolución convergente a un plegamiento estable. No obstante, la hipótesis más aceptada propone que la relación evolutiva entre ellas es divergente. Esto es, que a partir de un ancestro común que se sugiere poseía una sola función, se derivaron a través de la evolución proteínas con el mismo plegamiento pero con funciones muy diversas (Sternier & Höcker, 2005).

1.2.2 Estructura

El dominio de barril TIM típicamente está constituido por unos 250 residuos, pero puede ser de solo 200 residuos. Las enzimas con plegamiento de barril $(\beta\alpha)_8$ pueden ser pequeñas formadas por solo un dominio, como la hevamina, o muy grandes, tal como el caso de la L-galactosidasa constituida por cinco dominios (Wierenga *et al.*, 2001).

La diversidad de funciones que poseen los barriles TIM se debe aparentemente a la construcción modular del plegamiento. Este se caracteriza por una estructura secundaria que consiste en ocho unidades de hebras β – hélices α , las cuales se encuentran empacadas en una topología cilíndrica dada por los puentes de hidrógeno formados entre la primera y la última hebra de la β . Las hélices α por su parte se empacan alrededor del barril central de forma paralela (Fig. 3) (Patrick *et al.*, 2005).

En todos los barriles TIM conocidos se ha establecido una “cara catalítica” en la cual se encuentran localizados los residuos que intervienen en la catálisis. Dicha cara incluye el extremo carboxilo de las hebras β y las asas $\beta\alpha$. Esto implica que la geometría del sitio activo está dada por los residuos de las asas que se forman después de las hebras- β

(Wierenga *et al.*, 2001). Por otro lado, los residuos que mantienen la estabilidad de la estructura se encuentran localizados en la cara opuesta del barril (“cara estabilizante”) que incluye a las asas $\alpha\beta$. Esta división de la estructura de los barriles TIM probablemente esté relacionada con la versatilidad funcional y estructural del plegamiento $(\beta/\alpha)_8$. A pesar de las características que comparten los barriles TIM, existe diversidad geométrica entre ellos. La pérdida de puentes de hidrógeno entre hebras β adyacentes puede provocar distorsión en la estructura (Sternier & Höcker 2005).

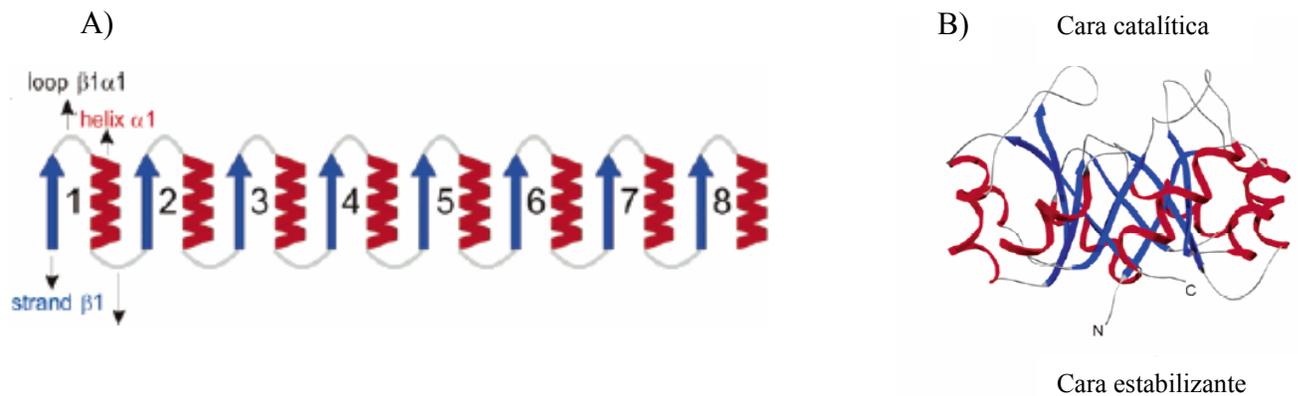


Figura 3. A) Esquema de la estructura de barril $(\beta\alpha)_8$ y unión entre hélices α y hebras β . B) Representación de la cara catalítica y cara estabilizante de los barriles TIM (Sternier & Höcker 2005).

1.3 Historia evolutiva de los Barriles $(\beta\alpha)_8$

Como se mencionó anteriormente, se han sugerido dos corrientes evolutivas que pudieron dar como resultado las distintas proteínas con plegamiento de barriles TIM así como de sus “parientes” que son aquellas enzimas que presentan ligeras variaciones con respecto al barril $(\beta\alpha)_8$. Una consideración importante que se plantea al iniciar un análisis evolutivo de los barriles TIM es su baja conservación de secuencia, lo cual dificulta la detección de relaciones evolutivas distantes. Una posibilidad está dada por el siguiente hecho; el plegamiento en cuestión es muy estable y muchas proteínas ancestrales con diferentes secuencias podrían haber adoptado este andamio. Tal vía convergente ha sido sustentada por la ausencia de homología de secuencia en los miembros de la familia de los barriles TIM (Reardon *et al.*, 1995).

Alternativamente, todas las proteínas que poseen estructura de barril ($\beta\alpha$)₈ podrían haber descendido de un ancestro común. La localización conservada del sitio activo en el carboxilo terminal del barril central en todos los barriles TIM conocidos (cara catalítica), así como las similitudes en la estructura tridimensional sugieren que una gran fracción de enzimas con estructura de barril TIM han divergido de un ancestro común por duplicación de genes y diversificación. En esta corriente de evolución divergente se justifica la ausencia de homología proponiendo que la enzima ancestral divirgió millones de años atrás. Algunos de los argumentos que sustentan esta teoría proponen que la enzima progenitora catalizaba una sola reacción, pero otras reacciones químicas pueden llevarse a cabo si se tiene un número limitado de mutaciones posteriores a una duplicación génica (especialización de enzimas) (Kinch *et al.*, 2002).

Acerca de la evolución de los barriles (β/α)₈ Gertl y colaboradores (2005), en sus estudios de la superfamilia mecanísticamente diversa de las enolasas, enzimas que adoptan este plegamiento, han sugerido que la modularidad del barril es una característica importante, pues la evolución semiautónoma de grupos funcionales críticos ha llevado a la generación de nuevos sitios de unión, así como nuevas actividades catalíticas de una manera combinatoria.

Por otra parte, en un estudio comparativo de dos enzimas que intervienen en la ruta de biosíntesis de histidina (HisA y HisF) se presenta una fuerte evidencia de cómo la mitad de un barril pudo dar origen a través de un primer evento de duplicación y fusión al barril ancestral del cual surgieron los barriles (β/α)₈ que hoy en día conocemos, siguiendo un segundo proceso de duplicación génica y adaptación (Fig. 4) (Lang *et al.*, 2000). Las enzimas analizadas en este estudio contienen un motivo de unión a fosfato en cada una de las mitades del barril, ambos son requeridos dada la naturaleza de sus sustrato bifosfatado. Este mismo motivo se encuentra en el C-terminal de otros barriles TIM pero no en el N-terminal, sugiriendo que el precursor de todos los barriles ($\beta\alpha$)₈, se trató de un medio barril con un motivo de unión a fosfato. En este caso, todas aquellas proteínas que han divergido demasiado han perdido esta característica ancestral (Nagano *et al.*, 2002).

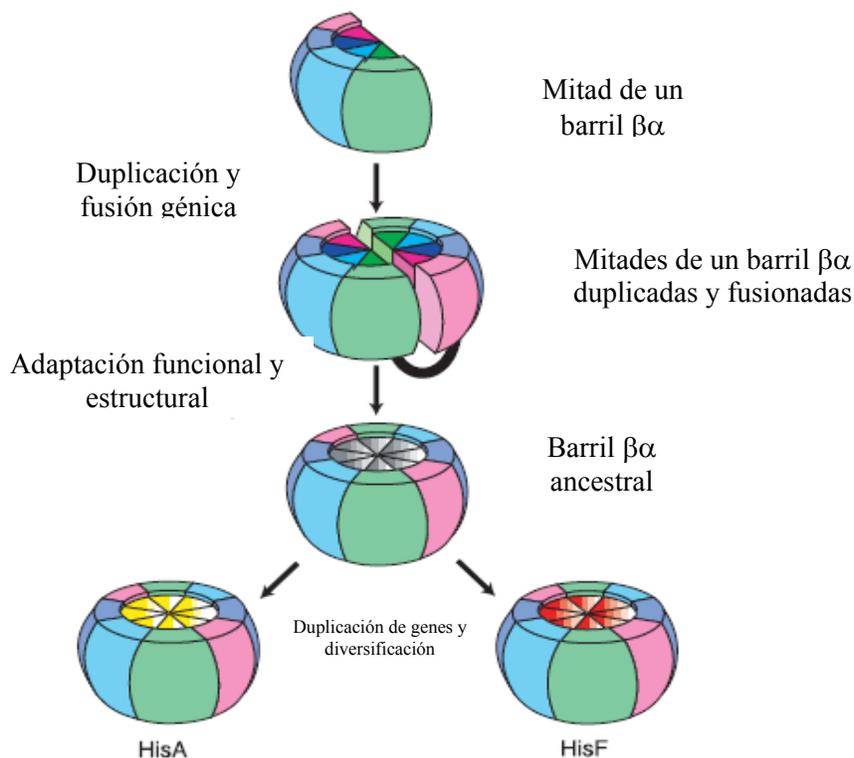


Figura 4. Esquema de la posible ruta evolutiva de los barriles TIM según el cual dicho proceso se dió por dos eventos de duplicación génica (Lang *et al.*, 2000).

1.4 Fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI o TrpF)

La biosíntesis de triptófano en microorganismos como *Escherichia coli* es un proceso de seis pasos, partiendo del corismato como el precursor inicial (Fig. 5). En el primer paso, el corismato es convertido en antranilato por la acción de antranilato sintasa, una enzima heterodimérica cuyos dos componentes sintasa/liasa están codificados en el gen *trpE* y un componente de glutamina amidotransferasa (*trpG*). El segundo paso es la adición de un motivo fosforribosil al antranilato para formar N-(5-fosforribosil) antranilato (PRA), el cual es catalizado por el producto del gen *trpD*, la enzima antranilato fosforribosil transferasa (AnPRT o TrpD). Luego PRA es convertido por una isomerasa (PRAI) (codificada por el gen *trpF* en la mayoría de los microorganismos) en 1- (o-carboxifenilamino)- 1-deoxirribulosa- 5- fosfato (CdRP), a partir de este compuesto se produce indol glicerol

fosfato (IGP) por acción de la enzima indol glicerol fosfato sintasa (IGPS) codificada por el gen *trpC*. Los dos pasos finales en la síntesis son catalizados por la triptófano sintasa (TrpA/TrpB), una enzima heterodimérica que produce la ruptura del gliceraldehído-3-fosfato para dar triptófano (Fig. 5).

En algunos genomas, los genes codificantes de proteínas que participan en pasos adyacentes en las rutas biosintéticas se encuentran fusionados. Por ejemplo en *Salmonella typhimurium* *trpE* y *trpG* están fusionados. La organización estructural de PRAI (*trpF*) difiere entre microorganismos: es un monómero en *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que en *E. coli* se encuentra fusionado con el carboxilo terminal de la indol glicerol fosfato sintasa IGPS (*trpC*). Ambos dominios -PRAI (*trpF*) e IGPS (*trpC*)- tienen un plegamiento de barril TIM (Fig.6), sugiriendo que provienen de un ancestro común. La enzima bifuncional puede ser disectada a nivel genético en proteínas monoméricas altamente activas catalizando sus respectivas reacciones (Eberhard *et al.*, 1995).

PRAI (que está codificada en el gen *trpF*) ha sido sujeta a distintos experimentos de ingeniería de proteínas, de los que se han desprendido muchas hipótesis respecto a la evolución de su función y estabilidad estructural (Eberthard *et al.*, 1995, Saab-Rincón *et al.*, 2005, Patrick *et al.*, 2005). Entre las distintas posibilidades para hacer evolución dirigida con los barriles TIM, las asas $\beta\alpha$, que suelen incluir residuos catalíticos importantes, han recibido recientemente una gran atención para crear variabilidad, no sólo con mutaciones puntuales, sino con cambios de posición o con la inserción de asas provenientes de otras enzimas (Ochoa-Leyva *et al.*, 2009).

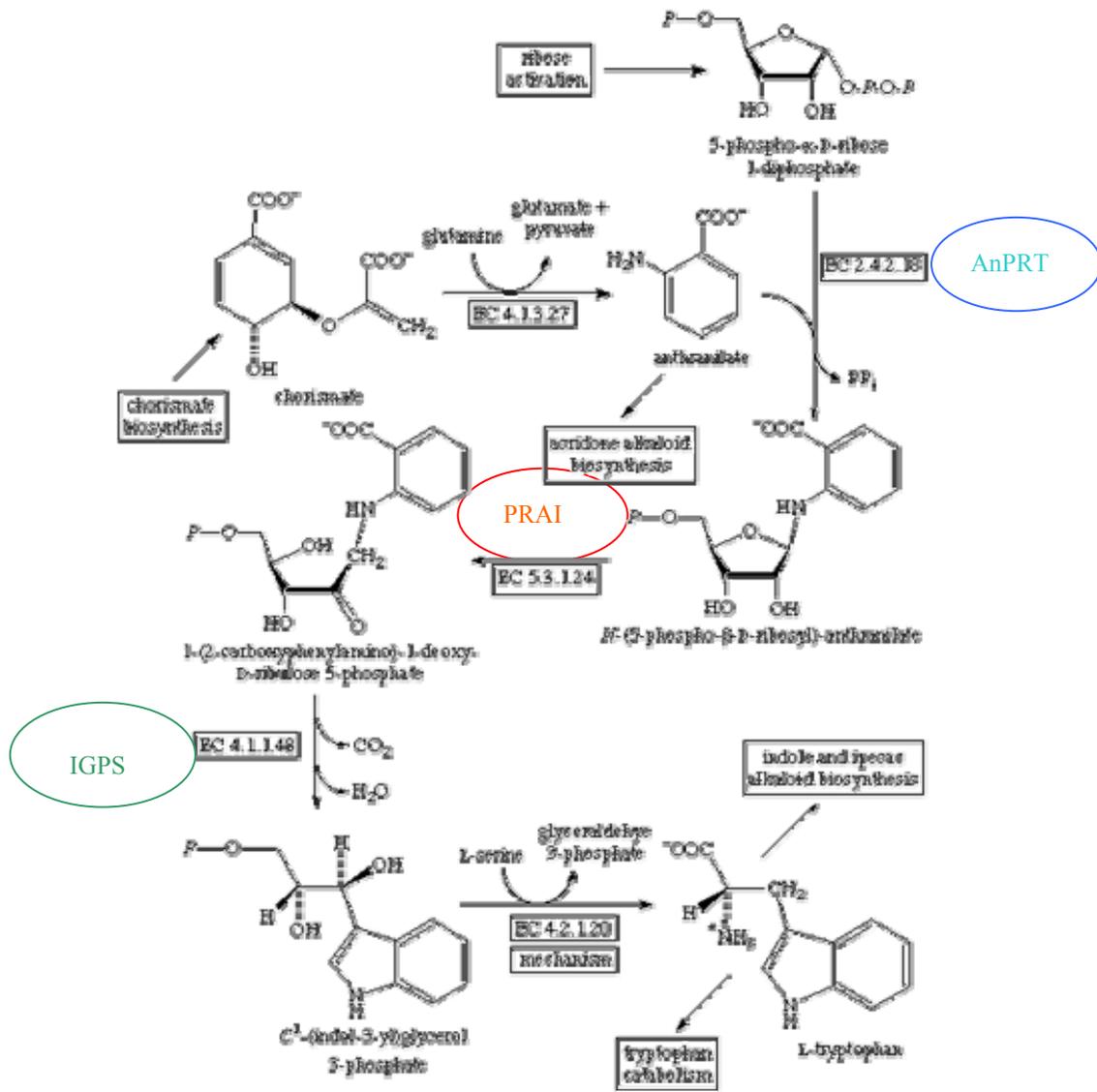


Figura 5. Ruta de biosíntesis de triptófano desde ácido corísmico, en rojo se señala la reacción que cataliza PRAI y en azul la reacción que cataliza AnPRT, en verde el paso de la ruta que cataliza IGPS.

El mecanismo de reacción más aceptado de ecPRAI involucra catálisis general ácido-base seguida de la isomerización espontánea de una aminoaldosa fosforilada a su correspondiente aminocetosa (Fig. 7). En el primer paso, el oxígeno del anillo de furanósido de PRA es protonado por el ácido general AH, formando como intermediario una base de Schiff (ión imino). El protón es abstraído del C2' de la ribosa por la base general B para formar la enolamina de CdRP. Alternativamente la enolamina puede ser generada en un sólo paso, el cual requiere que tanto el ácido como la base actúen de forma simultánea,

sin embargo, el primer mecanismo es el más aceptado (Henn-Sax *et al.*, 2002).

La conversión subsecuente de la enolamina de CdRP a la forma ceto ocurre espontáneamente y es independiente de la concentración de enzima. Se ha comprobado que los residuos que actúan como base y ácido general son Cys7 y Asp126, respectivamente, en PRAI de *Termotoga maritima*. Esto está sustentado en el hecho de que el pKa del grupo SH de la cisteína 7 es <6.8 , lo cual hace posible la abstracción del protón del C2' de PRA a pH fisiológico. En oposición, la cadena lateral del aspartato 126 no debe estar ionizado para protonar el oxígeno del anillo furanósido de PRA, y por tanto su pKa se debe incrementar considerablemente en comparación con el aspartato libre (Henn-Sax *et al.*, 2002).

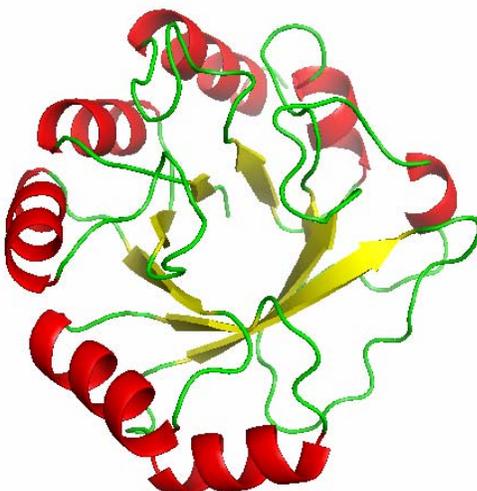


Figura 6. PRAI de *E. coli* es una enzima proveniente de una fusión con IGPS y que ha sido exitosamente separada a nivel genético manteniendo su actividad catalítica aparentemente intacta (Eberhard *et al.* 1995).

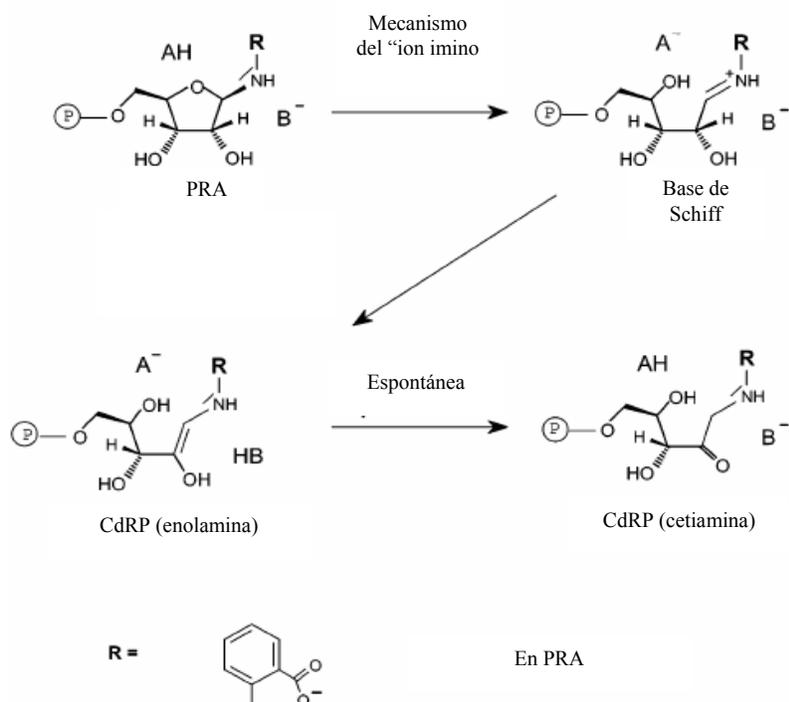


Figura 7. Mecanismo propuesto del rearrreglo de Amadori que cataliza ecTrpF. El ácido general (AH) es Asp126 y la base general (B) Cys7 (Henn-Sax *et al.*, 2002).

El conocimiento y elucidación de los mecanismos de las enzimas se ha logrado mediante la integración de acercamientos experimentales tales como: estudios cinéticos, detección de intermediarios, cristalografía de rayos X, modificaciones químicas de las cadenas laterales de los aminoácidos y mutagénesis sitio dirigida. Dichos acercamientos se complementan para dar como resultado un panorama completo del mecanismo catalítico de las enzimas (Price, 1996).

Las suposiciones derivadas de los diferentes estudios que se han realizado con PRAI pueden abordarse experimentalmente ensayando la actividad en variantes de la enzima portadoras de mutaciones. En el caso de muchas proteínas, además de ensayos de complementación de la función que relacionan características genotípicas con fenotípicas, es importante que los estudios funcionales involucren ensayos enzimáticos simples que permitan determinar parámetros cinéticos básicos (K_M y k_{cat}). Dichos parámetros cinéticos son una herramienta relevante para concebir los sucesos inducidos por evolución dirigida y por tanto incrementar el conocimiento acerca de las proteínas.

Tabla 1 Parámetros cinéticos (K_M y k_{cat}) de PRAI silvestre de *E. coli* y *Thermotoga maritima* y PriA, (actividad TrpF) de *Streptomyces coelicolor* (Hommel *et al.*, 1995 y Kuper *et al.*, 2005)

Organismo	Temperatura (°C)	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
<i>T. maritima</i>	80	1.03	116.8	113.4
<i>E. coli</i>	25	12.2	34.5	2.8
	37	22.9	74.7	3.3
<i>S. coelicolor</i> (PriA)	25	4	12	3

En el caso de la caracterización cinética de PRAI o de cualquier enzima que presente dicha actividad como es el caso de PriA (siguiente sección) se requiere para su análisis detallado, la producción *in situ* de su sustrato PRA, para lo cual se hace uso de la enzima que la precede en la ruta de biosíntesis del triptófano antranilato fosforribosil transferasa que a continuación se describe.

1.5 Fosforribosil isomerasa A (PriA)

Fosforribosil isomerasa A (PriA) desde el punto de vista evolutivo es una enzima interesante que representa un blanco ideal para experimentos de evolución *in vitro* ya que desde el momento de su descubrimiento (Barona-Gómez F. & Hodgson, 2003) se hipotetizó que se trataba de una isomerasa con especificidad de sustrato relajada que lleva a cabo dos actividades en vías metabólicas distintas, la de biosíntesis de triptófano (actividad TrpF) y la de histidina (actividad HisA). La bifuncionalidad de PriA ha sido comprobada mediante ensayos de complementación en cepas mutantes de *E. coli* afectadas en los genes *hisA* y *trpF*. Asimismo el estudio de la relación estructura-función de esta enzima se ha enriquecido con distintos acercamientos estructurales (Wright *et al.*, 2008).

PriA cataliza la misma reacción que PRAI es decir, un rearrreglo de Amadori tomando como sustrato PRA para dar como producto CdRP, mientras que en la ruta de biosíntesis de histidina, en su actividad de HisA toma ProFAR para dar PRFAR (Fig. 8) (Wright H. *et al.*, 2008). Posee un plegamiento de barril TIM (Fig. 9) al igual que sus homólogos TrpF y HisA, sin embargo, la identidad de secuencia así como la similitud estructural es más evidente al ser comparada con HisA. En cuanto a su caracterización cinética se han reportado los valores k_{cat}/K_M de $3 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ para la actividad TrpF y $0.3 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ para la actividad HisA (Kuper *et al.*, 2005).

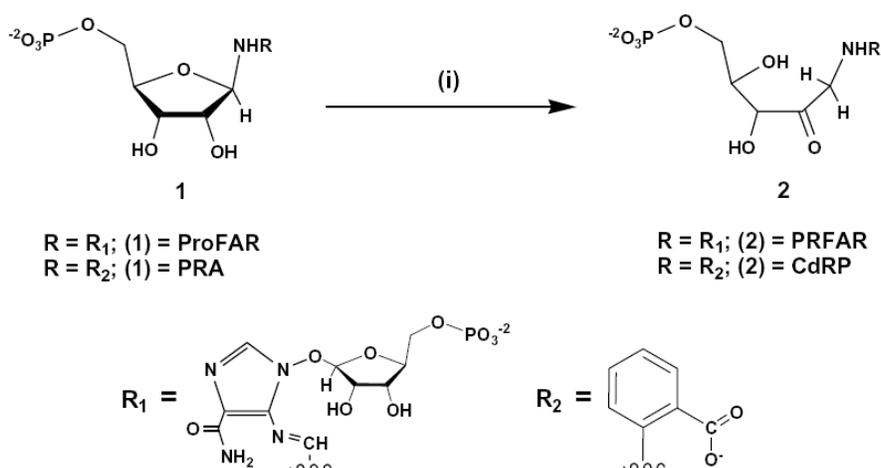


Figura 8. Reacciones enzimáticas de PriA (TrpF y HisA) ambos casos son rearrreglos de Amadori con sustratos análogos PRA o ProFAR para dar como producto CdRP y PRFAR respectivamente.

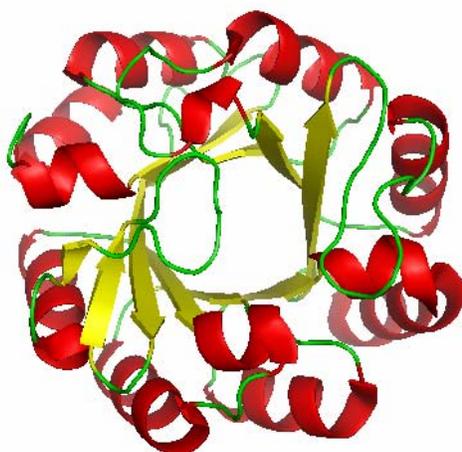


Figura 9. Estructura tridimensional PriA de *Streptomyces coelicolor* (PDB 2vep).

1.6 Ensayos enzimáticos acoplados

Una cantidad importante de reacciones catalizadas por enzimas presentan dificultades al momento de ser ensayadas directamente. Por tal razón, es común la aplicación de ensayos acoplados, en los cuales el producto de la reacción de interés se hace reaccionar con una segunda enzima que consuma dicho producto y que libere a su vez un compuesto que pueda ser monitoreado por algún método conocido. (Storer *et al.*, 1974). Los ensayos de este tipo son conocidos como ensayos acoplados y la o las enzimas auxiliares son llamadas frecuentemente enzimas acoplantes. Los ensayos acoplados más conocidos involucran la reducción de NAD(P)^+ , o la oxidación de las coenzimas reducidas correspondientes, sin embargo, hay muchas otras posibilidades. La elección de la o las enzima auxiliares depende sin lugar a dudas de la reacción de la enzima de interés (Frederik *et al.*, 1979).

Para la obtención de resultados válidos con el uso de ensayos acoplados, es esencial que la enzima acoplante nunca llegue a ser limitante de la reacción y que la velocidad determinada siempre este dada por la enzima de interés. La velocidad de la reacción catalizada por una enzima acoplante deberá depender de la concentración de sustrato disponible, el cual a su vez es el producto de la enzima bajo estudio. La concentración de este compuesto será muy pequeña al inicio de la reacción, provocando que la enzima acoplante solo esté trabajando a una velocidad que representa una pequeña fracción de su velocidad máxima. A medida que la reacción avance, la concentración del sustrato intermediario deberá incrementar, aumentando a su vez la velocidad de la enzima acoplante, hasta que ésta sea igual a la de la enzima de interés (en este caso PRAI). Cuando la enzima auxiliar ha alcanzado la velocidad de la enzima bajo estudio la concentración de sustrato intermediario permanecerá constante (Eisenthal, 2002).

Los ensayos acoplados se caracterizan por la aparición de una etapa lag en la velocidad de formación de producto final que será monitoreado. La eficiencia con la cual una enzima acoplante puede funcionar depende del valor de la K_M para su sustrato. Mientras más bajo sea este valor más eficiente es la enzima a bajas concentraciones de sustrato. El periodo lag

puede ser reducido incrementando la cantidad de enzima acoplante. Por otro lado, mientras mayor sea el valor de K_M se requerirá una mayor cantidad de enzima acoplante para obtener el mismo periodo lag (Eisenthal, 2002).

Otra posibilidad que dificulta la tarea de medir la actividad de una enzima se da cuando el sustrato no es lo suficientemente estable para determinar con exactitud su concentración. En estos casos, se presenta la posibilidad de obtener *in situ* el sustrato de la enzima a caracterizar haciendo uso de la enzima que antecede la reacción de interés.

1.7 Antranilato fosforribosil transferasa (AnPRT o TrpD)

La transferencia de grupos ribosilo entre una base aromática y grupos fosfato es una de las reacciones bioquímicas fundamentales en el metabolismo de nucleótidos y aminoácidos. La adición de grupos ribosilo se cataliza por las fosforribosil transferasas (PRTs) las cuales desplazan el motivo 1'-pirofosfato del sustrato 5'-fosforribosil 1-pirofosfato (PRPP), formando un enlace 1'-glicosídico-nitrógeno entre una base nitrogenada y un grupo fosforribosilo. El proceso contrario es catalizado por las nucleósido fosforilasas (NPs) y está relacionado específicamente con la remoción de la ribosa de nucleósidos por el rompimiento fosforolítico del enlace N - 1'glicosídico (Mayans *et al.*, 2002).

La enzima antranilato fosforribosil transferasa (AnPRT) está involucrada en la ruta de biosíntesis de triptófano y cataliza la formación de un enlace C-N entre PRPP y antranilato, estableciendo con esto el esqueleto precursor del triptófano (Fig. 10). Esta enzima puede unir en su sitio activo dos moléculas de AA y una de PRPP, también tiene dos sitios de unión a magnesio. Los sustratos se pueden unir independientemente a la enzima sugiriendo un mecanismo de reacción secuencial al azar Bi Bi (Marino *et al.*, 2006).

Dependiendo del microorganismo, la AnPRT es una enzima monofuncional o se puede encontrar fusionada a otras enzimas de la ruta biosintética. Se encuentra codificada por el gen *trpD* en la mayoría de los microorganismos (Lee *et al.*, 2005).

La antranilato fosforribosil transferasa de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido purificada y caracterizada cinéticamente demostrando que es un homodímero con un peso molecular de 83 kDa, con una eficiencia catalítica mayor en comparación con otras enzimas de diferentes microorganismos (Tabla 2).

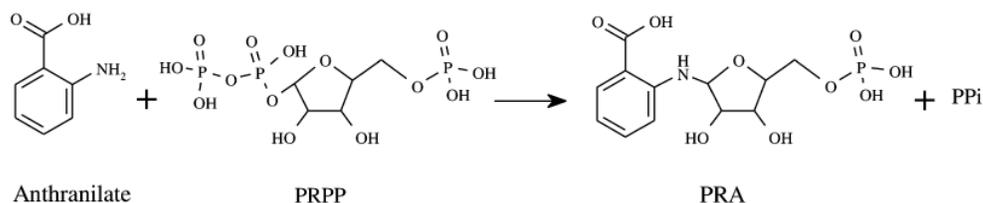


Figura 10. Reacción catalizada por AnPRT.

Tabla 2 Datos cinéticos del estado estacionario de AnPRT de *S. cerevisiae*, *S. solfataricus* y *E. coli* (Ivens *et al.*, 2001, Hommel *et al.*, 1989)

Organismo	T(°C)	$K_{M(AA)}$ (μM)	$K_{M(PRPP)}$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/K_{M(AA)}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k_{cat}/K_{M(PRPP)}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
<i>S. cerevisiae</i>	25	1.6	22.4	2.9	1.8125	0.1294
<i>S. solfataricus</i>	25	0.002	10	0.014	7	0.0014
<i>S. solfataricus</i>	60	0.0035	10	0.105	30	0.010
<i>E. coli</i>	25	0.28	50	4.4	15.7	0.088

1.8 Indol glicerol fosfato sintasa (IGPS o TrpC)

La indol-3-glicerol fosfato sintasa (IGPS) cataliza el quinto paso en la biosíntesis de triptófano, (Fig. 11A) pertenece a la amplia y versátil familia de los barriles ($\beta\alpha$)₈, (Fig. 11B). Posee una extensión poco usual en el amino terminal de aproximadamente 40 residuos que esta involucrada en la estabilidad térmica y unión del sustrato (CdRP), como ha sido demostrado en estudios de esta enzima proveniente de microorganismos

hipertermófilos como es el caso de *Thermotoga maritima* y *Sulfolobus solfataricus* (Schneider *et al.*, 2005). Al igual que PRAI, IGPS tiene un motivo de unión a fosfato en las asas β 7 y 8.

En particular la enzima IGPS de *T. maritima*, es un monómero que tiende a dimerizar en solución mediante la única cisteína expuesta que posee (C102). A diferencia de PRAI que es inhibida significativamente por su producto (CdRP) y que posee un sustrato inestable (PRA), tmIGPS presenta una baja constante de inhibición por producto. Esta constante es considerablemente menor a la presentada por sus ortólogos (IGPS de *E. coli* y de *S. solfataricus*). En cuanto al sustrato de IGPS (CdRP) presenta una vida media de 48 minutos a 80°C, por lo que no demanda su rápido procesamiento, no obstante, IGPS es lo suficientemente eficiente para prevenir la acumulación de CdRP que inhibe a PRAI (Tabla 3).

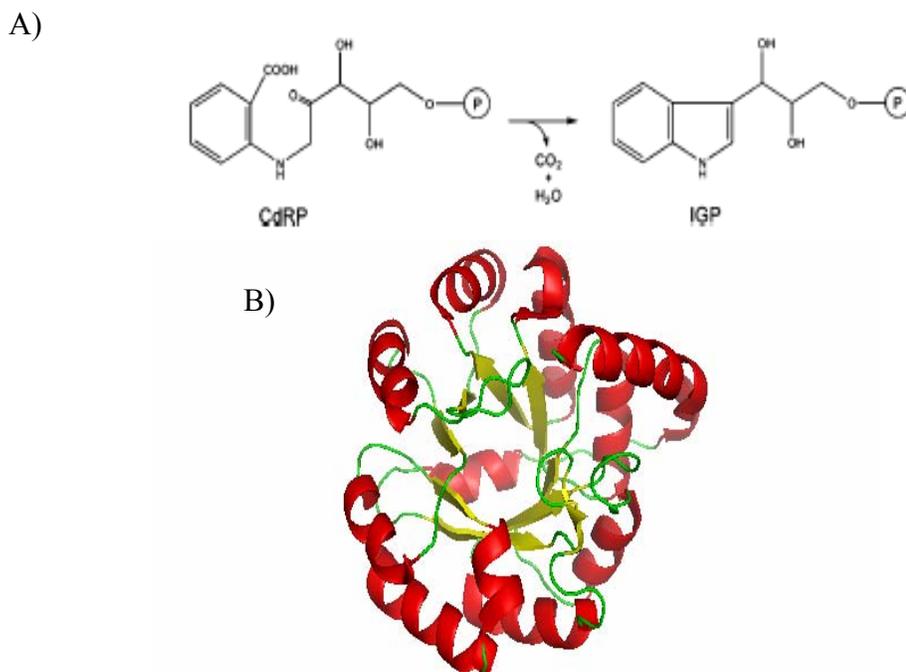


Figura 11. A) Reacción catalizada por IGPS o TrpC. B) Estructura tridimensional de IGPS de *T. maritima* (entrada PDB 1I4N).

Tabla 3 Datos cinéticos del estado estacionario ecIGPS y tmIGPS (Eberhard *et al.*, 1995, Schneider *et al.*, 2005)

Organismo	T(°C)	$K_{M(\text{CaRP})}$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_{M(\text{AA})}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
<i>E. coli</i>	25	0.47	3.2	6.8
<i>T. maritima</i>	25	0.025	0.095	3.8

1.9 La caracterización enzimática como herramienta para comprender los procesos de evolución natural y dirigida

Existen en la literatura diversos ejemplos de la importancia de la determinación de los parámetros cinéticos de las proteínas para lograr un mayor entendimiento de los procesos evolutivos que ocurren naturalmente así como los llevados a cabo en el laboratorio. En particular es muy interesante la forma en que se ha visto enriquecido el conocimiento de la relación estructura/función de la ampliamente estudiada superfamilia mecanísticamente diversa de las enolasas. En este caso, el entendimiento de los principios evolutivos empleados por la naturaleza para la adquisición de nuevas funciones enzimáticas puede revelar información crucial para el discernimiento de las funciones de miembros desconocidos de la superfamilia así como el diseño de nuevas reacciones. Parte importante de las conclusiones obtenidas por Gerlt y colaboradores (2005) han sido sustentadas con la caracterización cinética de cada uno de los miembros de esta familia, por ejemplo sus hipótesis de los cambios de especificidad y mecanismos de reacción otorgados por variaciones en la secuencia y estructura han sido avalados por las constantes catalíticas y de Michaelis-Menten.

Un caso más de la enorme cantidad que existe, en el cual los parámetros catalíticos ayudaron al seguimiento del proceso evolutivo promovido en el laboratorio a través de mutaciones al azar seguidas de barajeo (*shuffling*) de genes, es en el caso reportado por Castle y colaboradores (2004). Con el objeto de mejorar la actividad de glifosato N-

acetiltransferasa (GAT) y con esto lograr una detoxificación en plantas de cultivo que acumulan glifosato en los merístemos. Partiendo de enzimas que poseen como sustrato natural acetil coenzima A y fueron “evolucionadas” para aceptar glifosato como nuevo sustrato. En este caso, el parámetro k_{cat}/K_M de las enzimas parentales fue el punto de partida para evaluar la mejora adquirida y además correlacionar las mutaciones presentes con los parámetros obtenidos, esto con el fin de encontrar el camino más apropiado para lograr la variante más eficiente con actividad GAT. En este proceso de evolución *in vitro* se seleccionaron los residuos con efectos positivos sobre k_{cat} y K_M y se eliminaron aquellos que ejercían un efecto negativo sobre dichos parámetros.

2 ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes en nuestro laboratorio

Teniendo como punto central a la evolución dirigida, se han desarrollado en el laboratorio distintas técnicas usando como modelo de estudio a PRAI; dichas técnicas han dado como fruto una importante cantidad de variantes de PRAI, incidiendo también en el desarrollo de técnicas de evolución dirigida que dan lugar a mayor diversidad. En este sentido, se han implementado experimentos que permiten generar grandes librerías de genes con un sistema binario, que permite una recombinación usando el sistema Cre-Lox. En este sistema, las mitades $\beta\alpha_4$ de ecPRAI (“medias naranjas”) se insertan separadas por un sitio de reconocimiento de la enzima recombinasa Cre en un plásmido que es empacado dentro de fagos; la librería se introduce por infección múltiple en células que expresan la recombinasa para obtener genotecas enormes, evitando al paso limitante que se da en la transformación de células por electroporación. Dicha técnica se ha probado en la PRAI monofuncional de *E. coli*. (Saab-Rincón *et al.*, 2005, Soberón *et al.*, 2004). Asimismo, se ha propuesto generar variabilidad más allá de la mutación puntual mediante la inserción de asas provenientes de otros barriles TIM en PRAI y la creación de bibliotecas combinatorias de estas construcciones.

Otra herramienta que a últimas fechas ha proporcionado resultados interesantes para los trabajos de evolución dirigida es la bioinformática, que integra conocimientos matemáticos y computacionales para analizar y comprender datos que derivan en la resolución de preguntas biológicas, a partir de dicha disciplina se ha logrado construir una enzima con actividad de PRAI a partir del alineamiento de secuencias de aminoácidos de enzimas ortólogas provenientes de microorganismos diferentes, denominada PRAI consenso (José Farias. No publicado. En colaboración con el grupo del Dr. Lorenzo Segovia IBt-UNAM)

En estos casos, independientemente del aumento de la variabilidad que enriquece a la evolución dirigida las variantes son seleccionadas *in vivo* usando una cepa de *E. coli*

auxótrofa para triptófano (carente del gen *trpF*). De esta forma se han aislado un número de variantes de PRAI que ameritan su seguimiento cinético, tales como:

- $\beta 1\alpha 4\text{PRAI}_{wt_LoxP_}\beta 5\alpha 8\text{PRAI}_{cons}$.
- $\beta 1\alpha 4\text{PRAI}_{wt_LoxP_}\beta 5\alpha 8\text{PRAI}_{wt}$.
- $\beta 1\alpha 4\text{PRAI}_{cons_LoxP_}\beta 5\alpha 8\text{PRAI}_{wt}$.
- $\beta 1\alpha 4\text{PRAI}_{cons_LoxP_}\beta 5\alpha 8\text{PRAI}_{cons}$.

Estas variantes son combinaciones de mitades silvestres (*wt*) y consenso (*cons*).

A pesar de los éxitos obtenidos mediante la aplicación de evolución *in vitro* en el laboratorio existen algunas limitaciones ya que los resultados obtenidos *in vivo*, a) no son suficientes para interpretar los acontecimientos a nivel molecular b) no dan información que permita enriquecer y racionalizar los métodos que deriven en mejores resultados de la actividad buscada.

Por lo anterior, se hace necesario el análisis de la cinética enzimática que enriquecerá la información acerca de las proteínas obtenidas por evolución dirigida en el laboratorio.

El estudio y caracterización cinética de las variantes obtenidas por evolución dirigida enriquecerá en gran medida la información ya obtenida, pues la selección que se lleva a cabo en el laboratorio necesita ser complementada a fin de conocer la medida y la forma en que se han alterado las características de la enzima. Por ejemplo, una caracterización cinética nos permitiría establecer si la alteración generada a nivel del gen ha modificado la afinidad por su sustrato (K_M), de qué magnitud es este cambio, su conveniencia para el fin que se persigue, y en algunas situaciones, la ruta a seguir para obtener los resultados deseados. Asimismo, la caracterización cinética nos puede ayudar a sustentar con mayor solidez las hipótesis planteadas, ya que se podrán establecer interconexiones entre los principales residuos que podrían estar afectando la unión (*binding*) de sustratos y aquellos que están involucrados en algún paso catalítico.

2.2 Antecedentes del ensayo enzimático de PRAI

Existe una enorme cantidad de información que se ha generado en torno a la biosíntesis de triptófano, incluyendo estudios cinéticos detallados de las enzimas involucradas en esta vía (triptófano sintasa, indol glicerol fosfato sintasa, antranilato sintasa), no así para PRAI debido a la hidrólisis espontánea que presenta su sustrato (Hommel *et al.*, 1995).

Por tal situación nos propusimos implementar en el laboratorio un ensayo enzimático acoplado, en el cual se partirá desde ácido antranílico y 5- fosforribosil pirofosfato (PRPP) utilizando como herramienta a la enzima antranilato fosforribosil transferasa (AnPRT) (que por sí sola es una proteína interesante) del hipertermófilo *Sulfolobus sulfataricus* para producir PRA *in situ* y transformarlo de forma consecutiva a CdRP por acción de PRAI (Fig. 12).

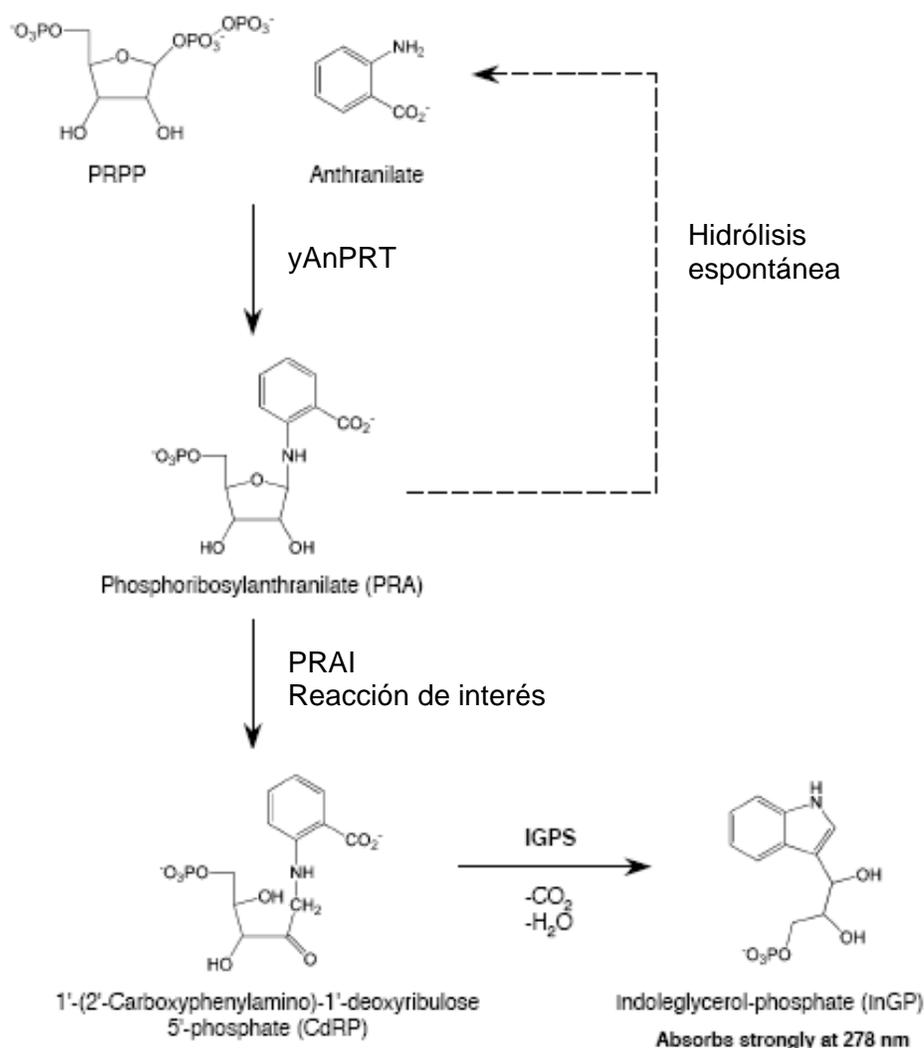


Figura12. Reacción de fosforribosil antranilato transferasa (PRT) acoplada a la reacción de PRAI y a su vez se adiciona la enzima IGPS para seguir la aparición de InGP (Patrick *et al.*, 2008).

La síntesis química del sustrato de PRAI (PRA) ha sido reportada previamente (Creighton, 1970), en la cual la reacción se da entre el ácido antranílico y ribosa-5-fosfato mezclados de forma unimolar durante 4 minutos a 25°C, posteriormente se diluye cien veces en buffer de trietanolamina-HCl pH 8.6.

El ensayo se inicia agregando la enzima que tiene únicamente actividad de PRAI y se observa el aumento en la absorbancia a 280 nm . Sin embargo, el PRA sintetizado químicamente no se puede purificar ni determinar la cantidad que se ha formado dificultando de esta manera la apropiada caracterización cinética de las enzimas con actividad de TrpF (Kirchner *et al.*, 1970).

Como ya se ha mencionado previamente, la labilidad de PRA (los productos de la hidrólisis espontánea de PRA son AA y ribosa-5-fosfato) representa un obstáculo para el análisis cinético de las distintas variantes de PRAI, ya que presenta una vida media de (constantes de velocidad de primer orden) : 449 s ($1.54 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) a 25°C, 291 s ($2.38 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) a 37 °C, 144 s ($4.82 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) a 50°C y 39 s ($21.74 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) a 80°C (Sterner *et al.*, 1996). Por lo cual se ha propuesto sintetizar enzimáticamente a PRA como prerequisite para estudiar detalladamente las características enzimáticas de cualquier variante de PRAI, esto es, la implementación de un ensayo enzimático acoplado. Esta propuesta presenta la ventaja de producir un sustrato para la enzima de interés químicamente puro y biológicamente activo (Sterner *et al.*, 1996).

La velocidad de hidrólisis de PRA esta dada por la ecuación

$$v_h = -d[\text{PRA}]/dt = k_h [\text{PRA}]$$

donde:

k_h = constante de velocidad de primer orden de descomposición de PRA

[PRA]= concentración de PRA.

El punto de partida para montar el ensayo cinético acoplado de PRAI es la expresión y purificación de AnPRT de *Sulfolobus solfataricus*, que es un microorganismo hipertermófilo perteneciente a la familia de Archeobacterias, que crece a elevadas temperaturas (55-90°C), lo cual representa ventajas para su purificación. La vida media de esta enzima a 85°C es de 35 min y 69 min a 70°C además de se ha podido expresar heterológicamente en mesófilos como *Escherichia coli*, logrando también su purificación de forma eficiente (Ivens *et al.*, 2001).

Mediante este ensayo se han caracterizado enzimáticamente distintas PRAIs (Hommel *et al.*, 1995). En este caso el grupo de variantes PRAI ya existentes en el laboratorio que esperan por ser analizadas son:

- En primera instancia PRAI monofuncional de *E. coli* (silvestre), como pieza fundamental para la comparación del resto de las variantes
- PriA al igual que PRAI es una isomerasa, que posee estructura de barril TIM, con una función dual debido a que interviene en la vía biosintética de histidina y de triptófano en *Streptomyces coelicolor* presentando actividad de TrpF así como de HisA (Barona *et al.*, 2003).
- Las construcciones de PRAI silvestre en combinación con PRAI consenso que lo ameriten.

Por otra parte, se ha reportado que el uso de una segunda enzima acoplante en el ensayo de TrpF sería indispensable en el caso de pretender un análisis del progreso temporal de la reacción, en lugar de la medición de velocidades iniciales, (Hommel *et al.*, 1995) dada la inhibición por producto que presenta la enzima de interés. Ésta segunda enzima es IGPS o TrpC. En una publicación reciente de Patrick y colaboradores., (2008) se asegura que el uso de un ensayo fluorimétrico no permite obtener una caracterización cinética de la mutante con una baja actividad de TrpF ($k_{cat}/K_M = 0.3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$) denominada (His)₆-PurF(1-04), pues en un intento por saturar a ésta enzima usando concentraciones de PRA de hasta 2.0 mM encontraron que, la señal del fluorímetro se saturaba y no les permitía seguir la desaparición del sustrato, proponiendo así, que lo más conveniente era realizar el ensayo espectrofotométrico acoplado IGPS, ya que la formación del producto puede ser monitoreado por el aumento de absorbancia.

Con este antecedente surge una nueva posibilidad para caracterizar mutantes, por ejemplo, con K_M más altas que la silvestre requiriendo una mayor cantidad de sustrato para ser saturadas.

2.3 Mutantes PRAI obtenidas por sustitución de asas provenientes de PriA

En la búsqueda de nuevas funciones enzimáticas la ingeniería de proteínas ha hecho uso tanto del diseño racional como de la evolución *in vitro*. Uno de los acercamientos más interesantes ha sido el uso de plegamientos estables ya existentes en la naturaleza a los cuales se les incorporan elementos funcionales para introducir una nueva actividad enzimática. Dichos elementos funcionales son por ejemplo, las asas involucradas en la unión o en la catálisis. En el 2006 Park y colaboradores demostró con la incorporación simultánea y ajuste de elementos funcionales seguida de un acercamiento de evolución dirigida que era posible insertar la actividad de β -Lactamasa dentro del plegamiento estable ($\alpha\beta/\beta\alpha$ metalohidrolasa) de una Glioxalasa II. Este plegamiento se encuentra ampliamente distribuido entre los reinos Eucaria, Arquea y Bacteria y ha divergido para dar lugar a una amplia variedad de reacciones.

En nuestro laboratorio se ha realizado un extenso trabajo siguiendo este concepto de incorporación de *loops* provenientes de otras enzimas en PRAI que es una enzima que posee un plegamiento ampliamente estudiado (barril TIM) y que presenta la ventaja de tener claramente diferenciada su cara catalítica y su cara estabilizante.

Por un lado con la elucidación del mecanismo de reacción de PRAI (Henn-Sax. *et al.*, 2002) se han identificado los *loops* que se encuentran involucrados en la catálisis, por ejemplo el *loop* 6 que forma una especie de tapa sobre el sitio activo (Patrick *et al.*, 2005) así como los residuos que llevan a cabo la catálisis; Cys7 (β 1) y Asp126 (β 6) . Y por otro lado con el descubrimiento y estudio a nivel de función-estructura de scPriA (Wright *et al.*, 2008) cuya bifuncionalidad la convierte en un interesante modelo de evolución natural, que además posee el mismo mecanismo de reacción y el mismo plegamiento que PRAI, se han identificado los residuos catalíticos y por ende su localización; Asp11 (β 1), Asp13(β 5), Thr166 (β 6), así como el papel funcional de los *loops* 1 y 6 cuya flexibilidad logra que el sitio activo se encuentre en una conformación abierta o cerrada. En este punto podemos hacer una comparación entre las asas 1 de PriA y la 6 de PRAI, ambas son de longitud relativamente grande, presentan una flexibilidad importante para la catálisis y forman una

tapa que cierra el sitio activo de sus respectivas enzimas y tienen un motivo conservado (GXXG) al centro de la asa.

Con la información anterior y la experiencia en el intercambio de *loops* sobre PRAI (Ochoa-Leyva *et al.*, 2009) se construyeron en el laboratorio librerías de variantes que contenían el asa 1 de PriA en la posición 6 de PRAI. Además se introdujo un elemento de variabilidad promovido mediante mutagénesis a saturación de un par de residuos, el que antecede al *loop* que se está insertando y el que lo precede. De esta manera se seleccionarían aquellos residuos que integren mejor al elemento recién incorporado dentro de la estructura de la enzima, ya que se ha comprobado que los residuos que se seleccionan tienen un efecto en la obtención de proteínas plegadas (Ochoa-Leyva *et al.*, 2009). Al llevar a cabo la complementación de la actividad TrpF del banco, (ensayos *in vivo*) en la cepa auxótrofa para triptófano se seleccionaron un par de mutantes que complementan la función en un tiempo similar a la PRAI silvestre (13 hr. aprox. en medio mínimo sólido) y que contiene como bisagra los residuos valina y triptófano (Mut 5) y aquella mutante que tiene los residuos leucina y arginina formando la bisagra (Mut 4).

HIPÓTESIS

- La obtención de los parámetros cinéticos de las diferentes variantes de PRAI permitirá discernir y entender la evolución molecular promovida artificialmente por evolución dirigida, permitiendo establecer resultados contundentes *in vitro* y postular distintos acercamientos para la obtención de nuevas proteínas.

OBJETIVO

- Implementar el ensayo cinético acoplado para caracterizar las variantes con actividad de fosforribosil antranilato isomerasa producto de la evolución dirigida y emplear este conocimiento para sugerir nuevos experimentos de evolución experimental.

Objetivos particulares

- Expresar y purificar las enzimas antranilato fosforribosil transferasa e indol glicerol fosfato sintasa que más se ajusten a las necesidades y requerimientos del ensayo.
- Montar y optimizar el ensayo enzimático para la actividad TrpF.
- Obtener los parámetros cinéticos para PRAI silvestre y PriA.
- Analizar las variantes ya construidas que presenten actividad PRAI y caracterizarlas enzimáticamente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Clonación y Purificación de *ssAnPRT*

En principio para montar el ensayo acoplado se amplificó el gen *trpD* que codifica para la antranilato fosforribosil transferasa (AnPRT) a partir de DNA genómico de *Sulfolobus solfataricus*, utilizando oligos 5' (Fw) y 3' (Rv) que contienen los sitios de restricción *BamHI* y *HindIII* respectivamente, así como un sitio de rompimiento trombina/tripsina para eliminar la cola de histidinas en caso de que interfiera con su actividad catalítica en el Fw':

5'-primer:

5'TTAGGATCCCTGGTTCCGCGTGGCAGCATGAACATTAACGAAATTCTGAAAA
AACTC-3'.

Rv 3'-primer:5'CCACAAAGCTTTAGTTTAACCACTACTTTTCA-3'.

La amplificación se realizó por PCR usando la enzima Taq polimerasa, mediante el siguiente protocolo: 5 min a 95°C, 5 ciclos de 40 s a 95°C, 40 s a 52°C y 1 min a 72°C, seguidos de 22 ciclos de 40 s a 95°C, 40 s a 53°C y 1 min a 72°C, finalizan con 8 min a 72°C. Una vez amplificado, el gen se digirió con las enzimas *BamHI* y *HindIII*. Por otra parte, el vector de expresión pQE40 (amp, Qiagen) que posee un sitio de policlonación (Anexo I-Tabla AI-1) se digirió de la misma manera con *BamHI* y *HindIII*.

La ligación de *ssTrpD* dentro de pQE40 se llevo a cabo por aproximadamente 14 hrs. a 16°C usando la ligasa del fago T4 (Fermentas) con su respectivo buffer. Una vez lograda la clonación se mandaron secuenciar 10 clonas presentando todas ellas 3 mutaciones de las cuales dos se consideraron como indeseables (F147V, P178S), por tal razón fueron corregidas por PCR mediante el uso de un *Megaprimer* que fue construido con los oligos Fw (5' CAAAAGAACTAGTCAATAAAAACGAATTTTCGTTTTCTCTTTGCAC 3') y Rv (5' ATTAGTCAATGGGACCTAGAAATATTG 3') conteniendo cada uno una de las correcciones (bases resaltadas).

3.2 Prueba de cepas para expresión de *TrpD*

Una vez corregido y ligado el gen en pQE40 la construcción denominada pQE40_ssAnPRT se transformó en diferentes cepas (Tabla 4) que además tienen un plásmido compatible que codifica para el represor lacI ya que pQE40 no tiene la secuencia para dicho represor. En primer lugar se tomó una colonia y se sembró en 5 ml de medio Luria Bertani (LB) adicionado con ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (25 µg/mL). Se creció 14 horas a 37°C, se tomaron 500 µl del cultivo anterior y se inocularon en 30 ml de LB con los antibióticos antes mencionados llevando este nuevo cultivo a una DO₆₀₀ de 0.5-0.7 a 37°C y 200 rpm, una vez alcanzada esta DO se indujo con isopropil tio-β-D- galactósido (IPTG) y se incubó el cultivo ya inducido por un periodo de 12 horas a diferentes temperaturas a 200 rpm. Después de dicho tiempo de inducción se centrifugaron los cultivos por 3 min. a 14000 rpm y se retiró el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.5. y se sonicaron (Sonicador Branson 2X2 min, nivel de potencia 5, pulso 50%, manteniendo la muestra en hielo). Posteriormente se centrifugaron y se separó cuidadosamente el sobrenadante de la pastilla, la cual se resuspendió en SDS al 1% y se analizaron ambas fases soluble e insoluble en gel de acrilamida SDS-PAGE.

Dada la ausencia de expresión en los experimentos anteriores se llevó a cabo la clonación de *sstrpD* de nueva cuenta pero ahora dentro del pET28b+. Esta segunda clonación se realizó amplificando el gen *sstrpD* a partir de la construcción pQE40_ssAnPRT que contenía la secuencia correcta utilizando el mismo protocolo de PCR antes descrito. Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Fw(5') (5' CTAGCTAGCCATATGAACATTAACGAAATT 3') que contiene el sitio *NheI* y el mismo oligonucleótido Rv que contiene el sitio de restricción *HindIII*.

Los ensayos de expresión tanto de ésta como de todas las enzimas usadas para el ensayo de TrpF se realizaron en distintas cepas ya caracterizadas para fines de sobreexpresión (Miroux *et al.*, 1996) (Anexo I, Tabla AI-2), sin embargo para el caso de ssAnPRT se probaron también distintas temperaturas de inducción con IPTG, así como distintas concentraciones del mismo (Tabla 4).

Tabla 4 Condiciones de temperatura y concentración de IPTG utilizadas en la expresión de la enzima AnPRT de *Sulfolobus solfataricus* todas inducidas por 12 horas

CEPA	TEMPERATURA DE INDUCCIÓN	[IPTG]
XL1-Blue	37°C	1mM
	25°C	1mM
MC1061 (PREP4)	37°C	1mM
M15 (PREP4)	37°C	1mM
	20°C	1mM
DH5 α Medio mínimo LB 2Xyt	22°C	1mM
BL21 (DE3)	22°C	1mM
MC1061 (PREP4)	15°C	0.1 mM
M15(PREP4)	15° C	0.5 mM

Una vez expresada ssAnPRT, se realizó un Westernblot aprovechando su fusión a 6xhistag, con un anticuerpo que reconoce dicha fusión, denominado Anti6xhis-tag.

3.3 Clonación y expresión de ecPRAI y PRAIs obtenidas por evolución dirigida

Se amplificó el dominio monofuncional de PRAI [ML 256-452] de *E. coli* como ha sido previamente reportado (Eberhad *et al.*, 1995) a partir de vector pDAN5_ecPRAIwt usando los siguientes oligonucleótidos:

F_w 5' GCC ATA CCA TGG GGG AGA ATA AGG TAT GTG GC 3'

Rv 5'GTC CGA AAG CTT TCA TTA GTG GTG GTG GTG GTG GTG GGA TCC ATA
3'. Los sitios de clonación usados fueron *NcoI* y *HindIII* y el vector pET28b+ (Tabla 5).

De igual forma se clonó PRAI_CreLox, que es el mismo dominio monofuncional de PRAI de *E. coli* interrumpido por el sitio de reconocimiento de la enzima CreLox recombinasa.

La expresión se llevó a cabo diferentes cepas (Anexo I, Tabla AI-2) como ha sido previamente mencionado siendo Rosetta 2 la que derivó en mejores resultados. Primero se inoculó un cultivo de 50 mL con un preinóculo crecido durante 12 horas y se indujo a una DO₆₀₀ de 0.8 con una concentración de IPTG 0.5 mM, la temperatura y tiempo de inducción del cultivo fueron 20°C durante 15 horas.

3.4 Clonación y expresión de ecIGPS

Se clonó y expresó el dominio con actividad de IGPS de *E. coli* para lo cual se realizó una reacción de PCR usando como templado DNA genómico de la cepa MC1061 Δ thiE con los siguientes oligonucleótidos: Fw: 5' GAA TTC ATA TGC AAA CCG T 3'

Rv: 5' GCT ACC GGA TCC CTA TAC TTT ATT CTC 3', y el siguiente protocolo: 4min a 95°C, 2 ciclos de 2 min s a 95°C, 2 min s a 60°C, seguidos de 30 ciclos de 1 min s a 95°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C, finalizando con 7 min a 72°C.

Las enzimas usadas para la clonación fueron *NdeI* y *BamHI* respectivamente señaladas en los oligonucleótidos y el vector usado fue pET28 b(+). La etiqueta de histidinas quedo en el extremo amino de la proteína. Para la expresión de IGPS se probaron distintas cepas usadas para la sobreexpresión de proteínas, la que ofreció mejores resultados fue la cepa C41_pRIL.

3.5 Purificación de ssAnPRT, ecPRAIwt y ecIGPS yAnPRT y tmIGPS y mutantes a ensayar

Una vez lograda la expresión de ssAnPRT, ecPRAIwt y de ecIGPS se procedió a su purificación aprovechando la fusión a 6XHistag que permite su separación en una columna de purificación por afinidad activada con sulfato de níquel 100 mM. Primero se realizó la purificación con un cultivo pequeño por cromatografía de gravedad para establecer las condiciones de elusión idóneas. En el caso de ssAnPRT, un cultivo de 50 mL de células BL21 (DE3) transformadas con la clona denominada pET28_ssAnPRT se creció por 12 horas. Después de dicho periodo de crecimiento se enfriaron las células por 10 min, a 4°C y se centrifugaron a 10 000 rpm por 20 min a 4 °C. Se resuspendió la pastilla en 3 mL de buffer A (ver Anexo III) y se sonicó (Sonicador Branson 5 X 20 seg., nivel de potencia 5, pulso constante en hielo), posteriormente se centrifugaron las células para separar la fracción soluble de la insoluble a 13,500 rpm por 25 min a 4°C. Una vez separadas las fracciones se tomó el sobrenadante (fracción soluble) y se calentó a 65°C por 25 min. para desnaturalizar el resto de proteínas no resistentes a la temperatura y se centrifugó a 13,500 rpm por 25 min a 4°C. Por otra parte, se tomaron 2 mL de resina Ni-NTA (Qiagen) y se lavó con agua para retirar el etanol, se equilibró con 10 volúmenes de solución A. Posteriormente se mezcló el sobrenadante obtenido de la última centrifugación con la resina y se dejó en agitación por una hora a 4°C, transcurrido dicho periodo se colocó en una columna de cromatografía de gravedad (100mm x 20mm) y se dejó eluir, esta primer recolección contenía las proteínas que no se unieron a la matriz de níquel.

Una vez terminada la primer elusión se iniciaron los lavados, primero con la solución B, C, D y E (Anexo III) recolectando por separado todas las eluciones para verificar por SDS-PAGE en cual se ha eluído la proteína de interés.

Se inoculó un reactor conteniendo 10 litros de LB con un litro de cultivo crecido ON y se dejó creciendo por 20 horas aproximadamente igual que en el cultivo pequeño. La agitación fue de 200 rpm. Se siguió todo el procedimiento antes mencionado tomando una fracción de la pastilla total recuperada sólo para corroborar que había expresión de proteína.

También se cambió el sistema de purificación de cromatografía por gravedad por un sistema tipo FPLC (ÄKTA Amersham- Biosciences). En este caso se utilizó una columna

de cromatografía de afinidad HisTrap HP de 5 ml. (Amersham-Biosciences) que se activó con una solución de NiSO₄ 100 mM antes de cada purificación y se realizó un lavado con 25 mM de imidazol, posteriormente se programó un gradiente desde 25 mM hasta 300 mM en 60 min con un flujo de 2 ml/min. La proteína se dializó para retirar el imidazol.

Por otra parte, ecPRAIwt, PRAI-CreLox, scPriA, ecIGPS, mutantes M4 y M5, también se purificaron por afinidad con la columna anteriormente mencionada. El procedimiento fue el mismo realizado para ssAnPRT sólo cambia al buffer de sonicación (Anexo III). Todo el proceso se realizó a 4°C.

De igual manera estas proteínas fueron dializadas exhaustivamente después de su purificación, el buffer de cambio fue de fosfato de potasio 50 mM para ssAnPRT y ecPRAI y todas sus variantes y Tris-HCl 40 mM para ecIGPS, se adicionó EDTA 2 mM al buffer de diálisis y β-mercaptoetanol 1 mM para el caso de ecPRAI y ecIGPS. La diálisis se llevó a cabo utilizando membranas con un tamaño de poro de 12000-14000 Da (Spectra por VWR Scientific) bajo agitación por 18 horas a 4°C, se realizaron 3 cambios de buffer.

Una vez dializadas se agregó glicerol hasta una concentración de 15% y se congelaron a -70°C con excepción de ecIGPS que presenta una gran tendencia a la agregación e inactivación.

En la búsqueda de un sistema robusto para medir la actividad enzimática de las enzimas con actividad PRAI se purificaron otras enzimas auxiliares más eficientes; antranilato fosforribosil transferasa de *Saccharomyces cerevisiae* e indol glicerol fosfato sintasa de *Thermotoga maritima*. La primer enzima se tenía clonada en un vector con promotor T7 y con 6XHistag en el carboxilo terminal (pET28b+), por lo que se procedió a realizar pruebas de expresión y solubilidad en diferentes cepas de expresión para posteriormente purificar por afinidad como con las enzimas previas. Se eligió la cepa Rosetta 2 como la mejor opción, se preparó un cultivo de un litro creciéndolo a 37°C hasta DO_{600nm} de 0.7 y se indujo con 1 mM de IPTG por 15 horas a 20°C, después de dicho periodo se centrifugaron las células a 6000 rpm por 20 minutos y se resuspendió la pastilla en buffer de lisis para

yAnPRT (Anexo III), se sonicó seis veces por 20 segundos con intervalos de un minuto entre cada una en hielo. Se centrifugó a 10000 rpm por una hora y se recuperó el sobrenadante el cual fue filtrado e inyectado en la misma columna (HisTrap HP) conectada al Äkta (sistema de purificación tipo FPLC) para su purificación por afinidad. Dicha columna fue activada con sulfato de níquel como en casos anteriores. La enzima eluyó a 180 mM de imidazol aproximadamente. Las fracciones que contenían a la enzima se dializaron por 18 horas en buffer de diálisis de yAnPRT (Anexo III), posteriormente se concentraron y se agregó glicerol hasta una concentración de 15% y se guardó a -70°C .

En el caso de tmIGPS, dicha enzima estaba clonada en el vector pET22a (que se regula bajo el promotor T7) pero con un codón de paro antes de la 6xHistag por lo que se procedió a purificar en una columna de intercambio aniónico (Mono Q 4.6/100 PE, Amersham Biosciences) usando como buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.5, el gradiente se 300 mM de NaCl.

Se subclonó tmIGPS en el vector pQE-I marcando con etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal para su purificación mediante columna activada con sulfato de níquel 100 mM como en los casos anteriores.

La cepa en la que se obtuvo una mayor cantidad de proteína soluble fue la C41_pGroEL-GroES la cual contiene un plásmido que posee características que ayudan al plegamiento de algunas enzimas y tiene que ser inducido con L-arabinosa a una concentración de 0.2% m/v desde el momento de inocular el cultivo. Una vez que dicho cultivo alcanzó una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.8 se indujo con 0.5 mM de IPTG y se mantuvo en incubación y agitación a 30°C por 12 horas. El proceso de purificación es similar al de la enzima anterior salvo por el hecho de que al ser una enzima de un microorganismo hipertermófilo, después de sonicar y obtener el sobrenadante se calentó por 15 minutos a 75°C , procedimiento que ayuda a eliminar una gran cantidad de proteínas provenientes de *E. coli*, después de tal calentamiento se volvió a centrifugar y se recuperó nuevamente el sobrenadante el cual después de ser filtrado a través de membranas de 0.22 μm se inyectó a la columna HisTrap HP (Amersham Biosciences) activada con NiSO_4 100 mM y conectada a un sistema FPLC para su

purificación. La elusión de la proteína se dio a una concentración de 150 mM de imidazol. Los buffers de purificación se muestran en el Anexo III.

3.6 Cuantificación de proteínas purificadas

Una vez purificadas, la cuantificación de proteínas se realizó en principio por el método colorimétrico usando el reactivo BioRad *protein assay* (Bradford 1976) y BSA como estándar. En el caso de PRAI monofuncional de *E. coli* se tiene el dato del coeficiente de extinción molar a 280 nm que es $\epsilon_{280} = 1.10 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$, (Eberhard *et al.*, 1995) y el resto de las enzimas a ensayar se cuantificaron obteniendo el coeficiente de extinción molar teórico a partir de la secuencia de aminoácidos usando la siguiente ecuación:

$$\epsilon_{\text{GdnHCL}(280)} (\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = (\#\text{Trp})(5685) + (\#\text{Tyr})(1285) + (\#\text{cistinas})(125)$$

La absorbancia de la proteína desnaturalizada con hidrocloreuro de guanidina 6 M se midió a 280 nm (Pace *et al.*, 1995).

3.7 Ensayo enzimático acoplado (*ssAnPRT-PRAI-IGPS*)

3.7.1 Ensayo fluorimétrico

El ensayo enzimático se realizó fluorimetricamente, dadas las características que presentan las sustancias que intervienen en la reacción (Hommel *et al.*, 1989). La mezcla que se utilizó para dicha reacción fue: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 2 mM, ditiotretitol 0.4 mM, EDTA 0.5mM, en cuanto a los sustratos de AnPRT, de ácido antranílico (Sigma Aldrich) se usaron concentraciones desde 2 μM hasta 200 μM y PRPP (Sigma Aldrich) se mantuvo constante en todos los casos en un exceso de 1 mM.

La determinación de las concentraciones idóneas de enzimas auxiliares (AnPRT e IGPS) se realizó variando la concentración de estas enzimas manteniendo constante la concentración de sustratos.

La reacción en principio para formar PRA enzimáticamente se llevó a cabo usando ssAnPRT a una temperatura de 60°C y se inició con la adición de dicha enzima así como tmIGPS. Las mediciones se realizaron en un fluorímetro (TECAN) usando longitudes de onda de excitación y emisión para el ácido antranílico de 310 y 400 nm respectivamente.

Con la obtención de la enzima AnPRT de un organismo mesófilo (*S. cerevisiae*) se pudo realizar la totalidad del ensayo a 25°C evitando así que PRA se hidrolizara más rápidamente debido a la temperatura a la cual se estaba formando (60°C) con el uso de ssAnPRT.

Dado el decremento de fluorescencia debido a la desaparición de AA se inicia la siguiente reacción una vez que la señal es constante, adicionando la enzima con actividad de PRAI a analizar, una vez que la mezcla de reacción hubiera alcanzado 25°C en los primeros ensayos realizados con ssAnPRT a 60°C, el proceso enzimático se monitorea por 10 minutos siguiendo la disminución de fluorescencia por la desaparición de PRA (longitud de excitación 310 nm emisión 400 nm) ya que la producción del *quantum* es 50 veces mayor que la del producto de la reacción, CdRP.

3.7.1.1 Determinación de velocidades iniciales y parámetros catalíticos

Una vez obtenidos los progresos temporales de la reacción de PRAI se determinaron las velocidades iniciales con la parte lineal de la curva del progreso temporal de la reacción en donde se observa el consumo de PRA.

Los parámetros catalíticos se obtuvieron mediante ajustes no lineales a la ecuación de Michaelis-Menten usando el programa *MicroCal Origin* versión 5.0 el cual trabaja según el algoritmo de Levenberg-Marquardt, tomando en cuenta para el ajuste las desviaciones estándar obtenidas de los triplicados de cada ensayo, para dicho ajuste se graficaron las velocidades iniciales contra las respectivas concentraciones de sustrato (PRA) utilizadas.

3.7.2 Ensayo espectrofotométrico

Un segundo método para el ensayo de la actividad de PRAI es acoplando IGPS. En este caso se sigue la aparición de indol glicerol fosfato (IGP) en el espectrofotómetro a 278 nm. Para esto se monitoreó primero la formación de PRA en el fluorímetro por acción de AnPRT, posteriormente se llevó la mezcla de reacción a la cubeta del espectrofotómetro y se adicionó ecIGPS (0.1 μ M) mezclado perfectamente, la reacción se inició agregando ecPRAI para obtener la velocidad inicial con el coeficiente de extinción molar de IGP 5590 M⁻¹ cm⁻¹ (Patrick et al. 2008).

3.8 Actividades específicas de enzimas quiméricas

La caracterización de un grupo de enzimas se realizó a partir de extractos crudos determinando la actividad específica. Todas las construcciones se tienen en el vector pDAN5 para fines de recombinación y generación de genotecas. Las construcciones se introdujeron en una cepa MC1061 deletada del gen *trpF*. Se crecieron en medio LB durante 16 horas a 37°C. Se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron las pastillas en buffer de lisis de PRAI (Anexo III) para su posterior sonicación como ha sido antes mencionado con otras proteínas. Se centrifugaron las a 10000 rpm por una hora y se recuperó el sobrenadante. Se adicionó β -mercaptoetanol a una concentración de 2 μ M. Posteriormente se realizaron los cálculos determinando las concentraciones de proteína contenidas en el extracto por el método de Bradford como ha sido mencionado anteriormente. El ensayo enzimático se realizó agregando AA a una concentración saturante de 100 μ M para que por acción de yAnPRT fuese convertido a PRA. Se adicionó una concentración igual del extracto preparado de cada variante al ensayo. Se obtuvieron las curvas de desaparición de sustrato monitoreadas por el cambio de fluorescencia y con las curvas del progreso temporal de la reacción se obtuvieron velocidades a partir de la pendiente inicial. Una unidad de actividad enzimática se refiere a la cantidad de enzima que consume 1 μ M de PRA por minuto a 25 °C.

3.9 Cinéticas de crecimiento de las enzimas caracterizadas

Se electroporaron los siguientes plásmidos: pDAN5_wtPRAI, pDAN5_wtPriA, pDAN5_M4, pDAN5_M5 y pDAN5_Ped1(control negativo) en la cepa JM101 $\Delta trpF$, se plaquearon en LB/Amp, se tomaron tres colonias aisladas y se crecieron por 12 horas en LB/Amp líquido. Se lavaron las células cuatro veces con sales M9 1x y se midió la DO a 600 nm para normalizar la cantidad de células con las que se inocularían 3 ml de medio M9 de modo que se iniciaran las cinéticas a una DO_{600nm} de 0.05. Se tomaron medidas cada 2 horas. También se realizaron las cinéticas en LB/Amp tomando medidas de la DO cada hora en este caso.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Clonación y expresión de las proteínas

La caracterización cinética de las enzimas con actividad PRAI sometidas a métodos de evolución dirigida requiere la producción *in situ* del sustrato de las enzimas a ensayar (PRA). Esto hace necesario el uso de la enzima AnPRT. Dicha enzima acoplante se obtuvo amplificando por PCR el gen a partir del DNA genómico de *Sulfolobus solfataricus* para clonarla, expresarla y purificarla como ya ha sido reportado (Ivens *et al.*, 2002) dado que es un hipertermófilo se espera que esta proteína tenga algunas ventajas para su purificación con respecto a las proteínas de un mesófilo. Para empezar, se llevó a cabo la clonación del gen antes mencionado en pQE40, el cual se secuenció encontrando tres mutaciones de las cuales una de ellas se consideró como sinónima; sin embargo las dos restantes sí dieron cambio de aminoácido (F147V, P178S). Con esta situación se procedió a realizar todo de nueva cuenta desde la amplificación del gen a partir de DNA genómico hasta la clonación en pQE40; estas segundas clonas se secuenciaron comprobándose que seguían apareciendo las mismas tres mutaciones.

En vista de estos resultados se optó por la evaluación mediante un alineamiento de aproximadamente 60 secuencias de enzimas homólogas reportadas para conocer la ubicación y la función de los aminoácido cambiados. Dicho alineamiento reveló que a pesar de que la identidad de secuencia entre estas enzimas es de 20 %, las mutaciones estaban justo en residuos altamente conservados a lo largo de la familia a la que pertenece la enzima AnPRT, PRT-II y, aunque no se reporta que estén involucrados en la unión de PRPP o del magnesio, se considera que P178 juega un papel importante en el reconocimiento del ácido antranílico ya que al ser mutado por una alanina se presenta un aumento de K_m^{AA} de 300 veces con respecto al de la proteína silvestre (Marino *et al.*, 2006) y F147 pudiera tener un rol estructural más que catalítico.

Dadas estas observaciones se optó por corregir las mutaciones mediante un método que involucra la construcción por PCR de un *megaprimer* que debería incluir las correcciones.

Éste *megaprimer* sirvió para amplificar el resto de la secuencia para después clonar dentro del mismo vector (pQE40) pero ahora en los sitios *SpeI* y *HindIII*, manteniendo intacta la primera parte del gen que tenía la secuencia correcta (Fig. 13).

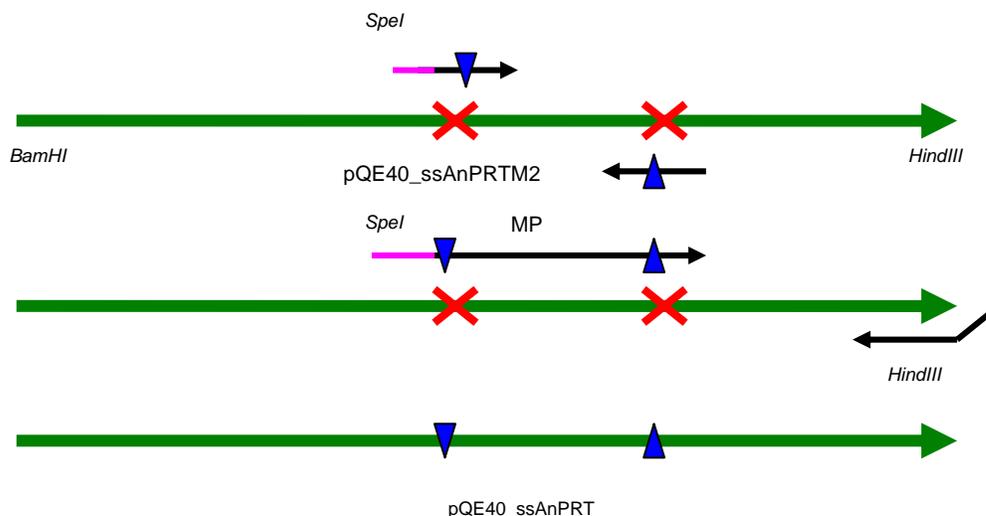


Figura 13. Esquema representativo del método de *Megaprimer* para cambiar las bases nucleotídicas indeseables (cruces rojas) por las correctas (triángulos azules).

Con el procedimiento anterior se obtuvo la secuencia reportada para el gen *trpD* y se procedió con los ensayos de expresión. Dado que el vector empleado no tiene la secuencia del represor *lacI* que es necesario para el control de la expresión mediante la adición de IPTG se tienen que usar cepas que previamente hayan sido transformadas con algún plásmido que contenga *lacI*; por tal motivo se emplearon cepas como MC1061(pREP4) y M15(pREP4) (pREP4) que además de contener el represor deseado tiene un origen de replicación compatible con pQE40. Sin embargo, los resultados que arrojaron los geles de poliacrilamida demuestra que no había expresión alguna (Tabla 5), pues se analizó tanto la fracción soluble como la insoluble de extracto celular. Dado esto, se probaron diferentes cepas para descartar la posibilidad de que la ausencia de proteína se debiera a la intoxicación de alguna de ellas; por ejemplo, se probó en XL1-Blue, que, aunque no es una cepa empleada en ensayos de expresión contiene una mutación ($lacI^q$) que la hace sobre producir represor *lacI*, obteniendo los mismos resultados negativos; también se usó DH5 α y BL21(DE3), esta última es una cepa ampliamente utilizada para expresar proteína pero en sistemas pET ya que expresa la RNA polimerasa del fago T7 necesaria para estos vectores.

En todos los casos se obtuvieron resultados negativos, por lo que se variaron las condiciones de inducción, así como la disminución de la temperatura de 37°C a 25°C y hasta a 15°C después de agregar IPTG ya que esto lleva a que la formación de proteína sea más lenta, permitiendo a la enzima plegarse correctamente evitando la formación de cuerpos de inclusión. Sin embargo, esto tampoco derivó en los resultados esperados, es decir, no se observó proteína ni en la parte soluble ni en la insoluble a pesar de que la secuencia era la correcta y el gen estaba en fase para su transcripción.

Dado lo anterior, se realizó una prueba más que consistió en realizar cultivos con inducción y sin inducción con IPTG; esto mostró que había una cantidad mayor de proteína en la fracción soluble en el cultivo sin inducir que en el inducido, dado que en éste último la producción de enzima dentro de la célula es tan rápida que se va mayoritariamente a cuerpos de inclusión. Este comportamiento fue muy similar aún con el uso de distintas cepas de sobreexpresión.

Con lo anterior, surgieron muchas dudas acerca de la proteína observada, que, aunque migraba correctamente en el gel de acrilamida no estaba inducida. Esto llevó a la realización de ciertos controles que permitieran verificar que la banda observada en el gel era en efecto la proteína de interés y no alguna proteína de la cepa misma, tales controles consistieron en la cepa con el plásmido pET28b+ (vacío) y la cepa BL21 (DE3) sin transformar con ningún plásmido. Los resultados muestran que efectivamente la banda sólo está presente en la cepa transformada con la construcción pET28_ *sstrpD* sin inducir (Tabla 5). Asimismo, se realizó un Westernblot para identificar a ssAnPRT con un anticuerpo monoclonal que reconoce la cola de 6 histidinas fusionada a la proteína. Dicho Westernblot resultó positivo despejando la duda mencionada anteriormente (Fig. 14A).

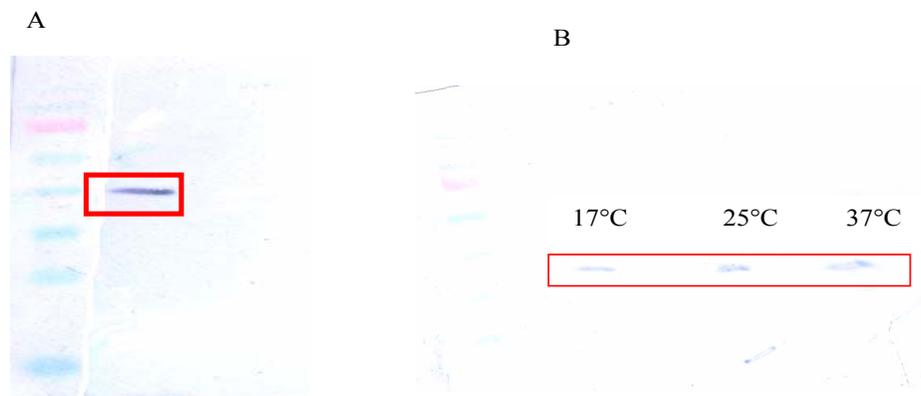
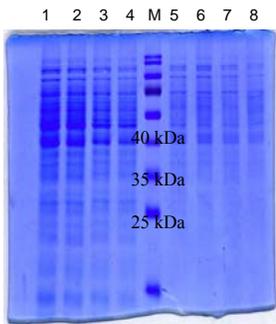
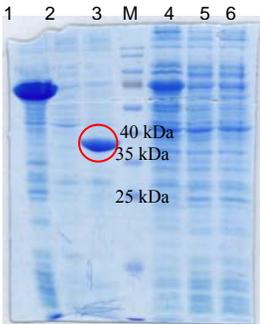


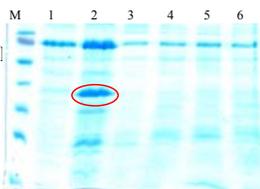
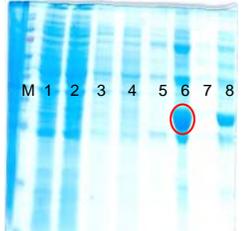
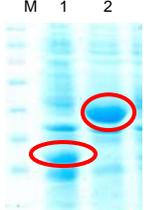
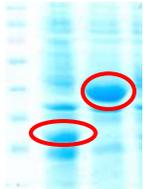
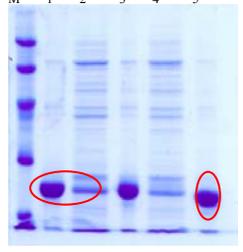
Figura 14. A) Westernblot de ssAnPRT fusionada a 6xHis-tag utilizando como anticuerpo monoclonal un Anti6XHis-tag que reconoce la epítotope de seis histidinas. B) Identificación por Western blot de ssAnPRT a diferentes temperaturas.

Posteriormente, se planteó la posibilidad de que la producción de proteína soluble se podría aumentar bajando la temperatura de crecimiento del cultivo pero sin inducir; esto no resultó en ningún cambio importante en la cantidad de ssAnPRT soluble (Fig. 14B) a 17, 25 y 37°C por lo que se continuó realizando a 37°C. También se realizó el experimento con cantidades de IPTG traza (0.05 y 0.01 mM) obteniendo resultados similares que sin inducir.

En cuanto al resto de las proteínas (PRAI y mutantes e IGPS), no hubo mayor problema en su clonación o expresión, pero sí se probaron las distintas cepas para ver en cual se obtenía mayor cantidad de proteína soluble (Tabla 5).

Tabla 5 Condiciones de expresión de las diferentes proteínas requeridas para el ensayo de PRAI así como los geles de acrilamida (SDS-PAGE) del análisis de dicha expresión

CONSTRUCCIÓN	CEPA(S)	TEMPERATURA Y TIEMPO DE INDUCCIÓN	CONCENTRACIÓN DE IPTG	GEL SDS-PAGE
pQE40_ssAnPRT	XL1-Blue, MC1061 (pREP4), M15 (pREP4), DH5 α BL21 (DE3)	37°C (14 hr.), 25°C (14 hr.), 15°C (14 hr.)	1mM, 0.1 mM, trazas	 <p>1 pQE40 C/IPTG Insoluble 2 pQE40 S/IPTG Insoluble 3 pQE40_trpD C/IPTG Insoluble 4 pQE40_trpD S/IPTG Insoluble 5 pQE40 C/IPTG Soluble 6 pQE40 S/IPTG Soluble 7 pQE40_trpD C/IPTG Soluble 8 pQE40_trpD S/IPTG Soluble</p>
pET28b_ssAnPRT	BL21(DE3)	15°C (14 hr.), 22°C (4.5 hr.), 30°C (14 hr.), 17°C (14 hr.)	1 mM	 <p>1 pET28b+_proteinaX Insoluble 2 pET28b+ Insoluble 3 pET28b+_trpD Insoluble 4 pET28b+_proteinaX Soluble 5 pET28b+ Soluble 6 pET28b+_trpD Insoluble</p>

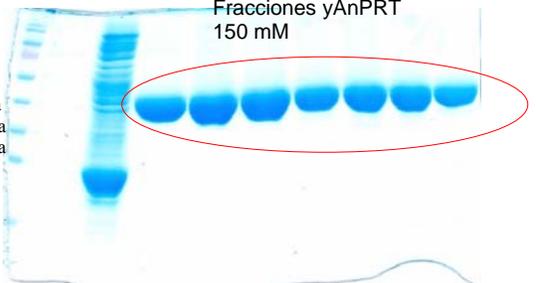
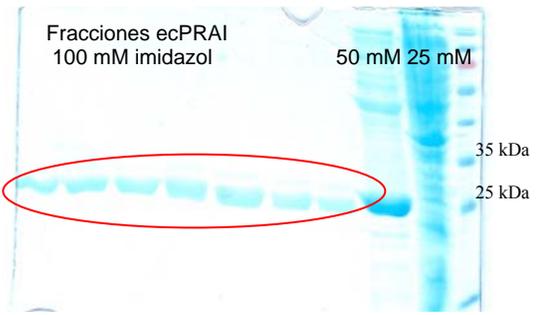
<p>PET_SSANPRT</p>	<p>BL21(DE3)</p>	<p>37°C (14 HR)</p>	<p>SIN IPTG</p>	 <p>1 PET28B+_SSANPRT C/IPTG SOLUBLE 2 PET28B+_SSANPRT S/IPTG SOLUBLE 3 PET28B+ C/IPTG 4 PET28B+ S/IPTG 5 BL21(DE3) C/IPTG 6 BL21(DE3) S/IPTG</p>
<p>pET28b_ecIGPS</p>	<p>C41_Pril</p>	<p>20°C (14 hr.)</p>	<p>0.4 mM</p>	 <p>1 pET28b+ Elusión buffer A 2 pET28b+_trpC Elusión buffer A 3 pET28b+ Elusión buffer B 4 pET28b+_trpC Elusión buffer B 5 pET28b+ Elusión buffer C 6 pET28b+_trpC Elusión buffer C 7 pET28b+ Elusión buffer D 8 pET28b+_trpC Elusión buffer D</p>
<p>pET21a_tmIGPS</p>	<p>C41_pGroEL- GroES</p>	<p>30°C (14 hr.)</p>	<p>0.5 mM</p>	 <p>1 pQEI+_tmIGPS 2 pET28b+_yAnPRT</p>
<p>pET28b_yAnPRT</p>	<p>Rosetta II</p>	<p>20°C (14 hr.)</p>	<p>1 mM</p>	 <p>1 pQEI+_tmIGPS 2 pET28b+_yAnPRT</p>
<p>pET28b(+) M4 Y M5</p>	<p>Rosetta II</p>	<p>20°C (14 hr.)</p>	<p>0.5 mM</p>	 <p>1 pET28b(+)_M5 2 pET28b(+)_M4 3 pET28b(+)_MX 4 pET28b(+)_MX 5 pET28b(+)_wtPRAI</p>

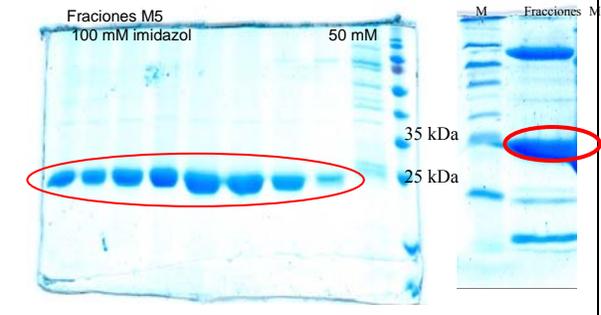
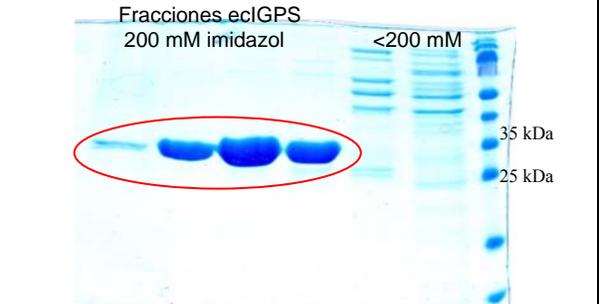
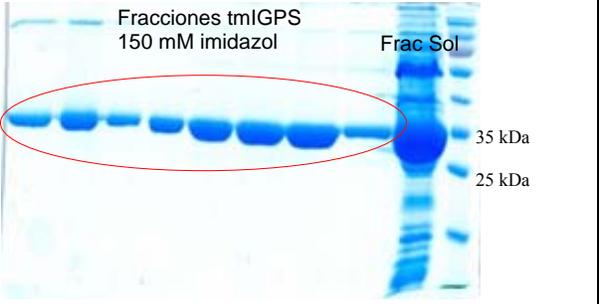
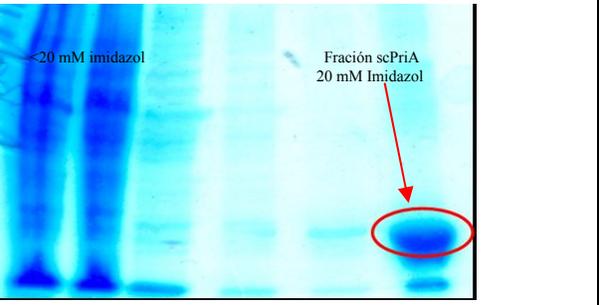
4.2 Purificación de las proteínas

Para la realización del ensayo enzimático es necesario tener las enzimas puras, ya que la obtención de algunos parámetros catalíticos (k_{cat} , k_{cat}/K_M) requiere del conocimiento de la concentración de enzima a caracterizar de forma pura. Con esto en mente, a todas las proteínas que se emplearían para el ensayo se les marcó con una etiqueta de histidinas que serviría para llevar a cabo la purificación por cromatografía de afinidad usando una columna activada con níquel. En todos los casos se obtuvieron proteínas puras ya que se asociaron con gran afinidad a la matriz, eluyendo a concentraciones de imidazol superiores a 100 mM para la mayoría de los casos (Tabla 6) excepto para scPriA que eluyó a 20 mM.

En el caso de ecPRAI silvestre, en las primeras purificaciones parecía migrar acompañada de otras dos bandas en los geles de acrilamida SDS-PAGE, llevando a pensar que se trataba de otras proteína que no se habían logrado separar en la purificación, sin embargo, al agregar una mayor cantidad de SDS al gel y al buffer de carga se logró ver una sola banda.

Tabla 6 Geles de acrilamida SDS-PAGE con las enzimas ssAnPRT, yAnPRT, ecPRAI, M4, M5, ecIGPS y tmIGPS purificadas por afinidad a níquel

CONSTRUCCIÓN	CONCENTRACIÓN DE IMIDAZOL DE ELUSIÓN	GEL SDS-PAGE
pET28b+_ssAnPRT	150 mM	<p data-bbox="933 541 1339 598">Fracciones ssAnPRT 150 mM imidazol <150 mM 25 mM</p>  <p data-bbox="1339 709 1404 798">40 kDa 35 kDa 25 kDa</p>
pET28b+_yAnPRT	100 mM	<p data-bbox="1079 1066 1274 1123">Fracciones yAnPRT 150 mM</p>  <p data-bbox="820 1165 885 1239">40kDa 35 kDa 25 kDa</p>
pET28b+_ecPRAI	100 mM	<p data-bbox="917 1501 1356 1558">Fracciones ecPRAI 100 mM imidazol 50 mM 25 mM</p>  <p data-bbox="1339 1617 1404 1690">35 kDa 25 kDa</p>

<p>pET28b+_M5</p> <p>pET28b+_M4</p>	<p>100 mM</p>	
<p>pET28b+_ecIGPS</p>	<p>200 mM</p>	
<p>pQE1_tmIGPS</p>	<p>150 mM</p>	
<p>pET15_scPriA</p>	<p>≈ 20 mM</p>	

4.3 Ensayo enzimático acoplado (*ssAnPRT-ecPRAI*) en fluorímetro

Una vez purificadas las enzimas se verificó primero si *ssAnPRT* tenía actividad. Para esto, se llevó a cabo una evaluación del espectro de emisión del ácido antranílico a una λ de excitación 310 nm comprobando que se tenía una emisión máxima a λ 400 nm (Fig. 15) como ha sido reportado previamente (Hommel *et al.*, 1995).

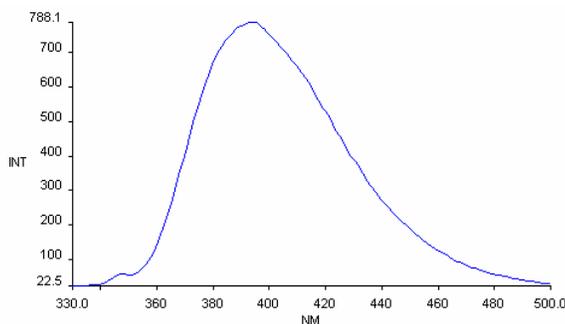


Figura 15. Espectro de emisión de AA a una longitud de onda de excitación de 310 nm.

La actividad de *ssAnPRT* fue verificada usando sólo una concentración de ambos sustratos (500 μ M PRPP y 2 μ M de AA). También se comprobó que la actividad seguía manteniéndose prácticamente igual después de algunos días de estar congelada a -70°C con glicerol al 15% (Fig. 16A).

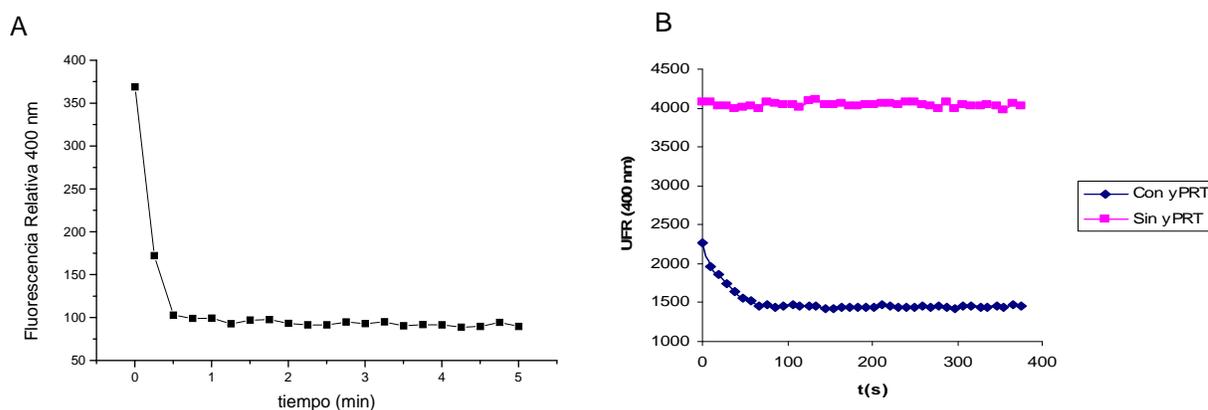


Figura 16. A) Progreso temporal de la reacción catalizada por la enzima *ssAnPRT* a 60°C purificada y congelada a -70°C con glicerol al 15% B) Progreso temporal de la reacción catalizada por la enzima *yAnPRT* (con y sin enzima) a 25°C .

Posteriormente se llevó a cabo el ensayo primero con la enzima PRAI silvestre, dado que los parámetros catalíticos ya están reportados y de esta manera se podrá tener un punto de comparación, para así caracterizar a las mutantes seleccionadas. El ensayo se realizó a diferentes concentraciones de AA, que a su vez fue transformado en PRA agregando ssAnPRT, en primera instancia se tomaron concentraciones de 0 a 100 mM, este último valor es aproximadamente 10 veces la K_M reportada (12 mM) con lo cual se satura la enzima (Hommel *et al.*, 1995).

Para la obtención de velocidades iniciales es necesario realizar una curva patrón de la respuesta del equipo (fluorímetro) a las diferentes concentraciones de AA y posteriormente de PRA cada vez que se realiza el ensayo, ya que la sensibilidad del equipo así lo requiere. Sin embargo, en los primeros ensayos utilizando ssAnPRT se observó que a concentraciones de AA mayores a 25 μM la conversión enzimática de PRA no era eficiente, pues los puntos se salían del comportamiento lineal esperado (Fig. 17A) por lo que se logró obtener y purificar en grandes cantidades otra enzima (yAnPRT) que es mucho más eficiente produciendo PRA, y que incluso tiene la ventaja de que no es necesario elevar la temperatura para que trabaje óptimamente dado que es de un organismo mesófilo (*S. cerevisiae*). Con esta nueva enzima se obtuvieron curvas que se ajustan bien a una recta, aún a concentraciones altas de AA (Fig. 17B), evidenciando con esto la mayor eficiencia de esta enzima con respecto a la anterior.

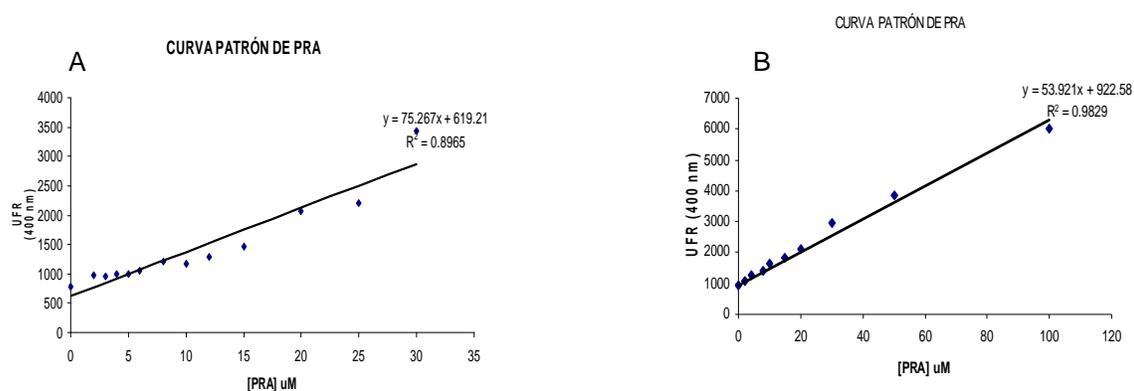


Figura 17. A) Curva patrón utilizada para la obtención de concentraciones de PRA a partir de las UFR durante el progreso temporal de la reacción del ensayo de la actividad TrpF usando ssAnPRT para producir PRA B) Curva patrón usando yAnPRT para producir PRA.

Por otra parte, también se realizó un ensayo con diferentes concentraciones de yAnPRT y manteniendo constante tanto los sustratos ($100 \mu\text{M}$ AA y $500 \mu\text{M}$ PRPP) como la concentración de PRAI (20 nM), lo que se pudo observar es que a distintas concentraciones de la enzima auxiliar, que fueron desde 1.5 hasta $6 \mu\text{M}$ no había cambio en la actividad de PRAI (Fig. 18), optando por utilizar una concentración de yAnPRT de $1.5 \mu\text{M}$ que fue la mínima probada.

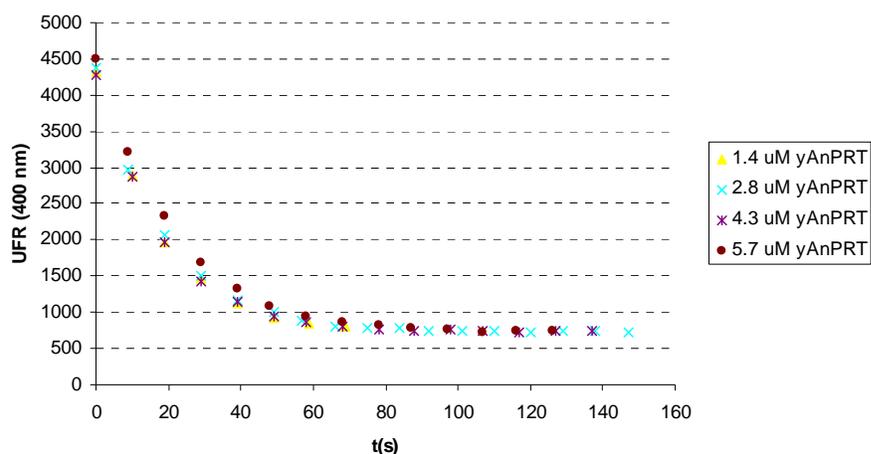


Figura 18. Progresos temporales de la reacción de ecPRAI silvestre usando diferentes concentraciones de yAnPRT para producir PRA.

Es importante señalar que ha sido difícil determinar las velocidades iniciales de ecPRAI silvestre sobre todo a bajas concentraciones de sustrato ($2\text{-}5 \mu\text{M}$), donde el cambio de fluorescencia es relativamente bajo, esto no sucede así a concentraciones de sustrato mayores donde las curvas temporales de la reacción permiten determinar la velocidad inicial certeramente. Por otra parte, si se agrega una menor cantidad de enzima la disminución de la fluorescencia se ve afectada por el “ruido” del equipo pero la medición de las velocidades iniciales es más confiable (Anexo II).

Dichas velocidades iniciales fueron determinadas trazando una tangente a la parte inicial lineal de la curva del progreso temporal de la reacción, y ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten usando el programa *MicroCal Origin* versión 5.0, dando valores de K_M

muy similares al reportado en la literatura; no obstante el error que se obtiene es (+/-) el 25%, en cuanto a las velocidades máximas el error es menor.

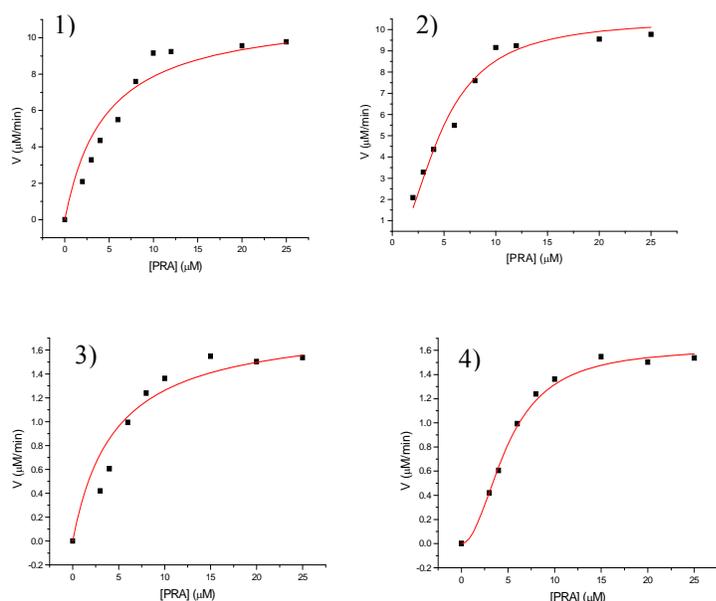
En los experimentos iniciales k_{cat} de ecPRAI era 20 veces menor al reportado, estableciendo con esto un problema que puede estar dado por una determinación errónea de la concentración de enzima o bien por el hecho de que la enzima al ser purificada se dializa y se congela a -70°C lo que podría ocasionar inactivación de la enzima. Para descartar estos problemas se realizaron los ensayos el mismo día de la purificación y se determinó la concentración de las enzimas mediante el uso del coeficiente de extinción molar en lugar del método de Bradford. Con estos cambios realizados se obtuvieron constantes catalíticas dentro del mismo orden de magnitud de las ya reportadas.

Por otra parte, los primeros datos (usando ssAnPRT y sin IGPS) fueron ajustados también a un modelo diferente, según la ecuación de Hill, dichos ajustes fueron mucho mejores que los de Michaelis-Menten, con valores n de 2 (Gráficas 2 y 4), esto resulta un tanto interesante y desconcertante a la vez, ya que en principio la enzima no es un dímero, sino que es una enzima que proviene de la separación del gen *trpCF* de *E. coli* (proteína bifuncional PRAI-IGPS) que ya ha sido previamente caracterizada (Eberhard *et al.*, 1995) sin mencionar algún tipo de cooperatividad cinética o histéresis. Lo mismo ocurrió en el caso de scPriA (Gráficas 1 y 3). En este caso scPriA ya ha sido caracterizada estructuralmente y se ha demostrado que presenta un cambio conformacional, puesto que posee un *loop* flexible (Wright *et al.*, 2008) que hace que la enzima se encuentre en una conformación abierta cuando esta sin sustrato y cerrada cuando une a cualquiera de sus dos sustratos (PRA o ProFAR).

Sin embargo, queda mucho por hacer para demostrar que el comportamiento sigmoidal se debe a un fenómeno de histéresis y si dicho fenómeno a su vez esta dado por un cambio conformacional lento de la enzima inducido por la unión de su sustrato o por equilibrio de asociación-disociación lento en el cual dos estados de polimerización difieren en sus actividades. En este caso, el comportamiento sigmoidal se ve afectado por la concentración de enzima (Eisenthal *et al.*, 2002).

Existen otras situaciones que producen un comportamiento sigmoidal alejado del descrito por Michaelis-Menten, que no necesariamente están relacionadas con fenómenos de cooperatividad cinética y se deben a la estabilidad de la enzima ante algunos componentes de la mezcla de reacción (Harding, 1969), que en este caso sería el sustrato ya que al aumentar su concentración la enzima parece ser más estable.

Sin embargo, la explicación más factible en este caso fue que la aparente histéresis dependía de cómo se iniciaba la reacción, es decir, en los primeros experimentos se tenía una *stock* con la enzima concentrada y se agregaba directo para iniciar la reacción, en los experimentos subsecuentes en los que no se observó una curva sigmoidal, se diluyó la enzima en la mezcla de reacción incompleta (sin sustrato) y se dejó equilibrar por algunos minutos antes de agregarla para iniciar la reacción.



Ecuación de Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación de Hill

$$v = \frac{V_{\max} [S]^{n_H}}{S_{0.5}^{n_H} + [S]^{n_H}}$$

Gráficas 1-4 Curvas de saturación de ecPRAI (1 y 2) y PriA(3 y 4) ajustadas al modelo Michaelis-Menten (1, 3) y la ecuación de Hill (2, 4) usando el programa Origin versión 5.0. Extrema inferior derecha, ecuaciones de Michaelis-Menten y Hill.

Tabla 7 Parámetros cinéticos de scPriA y ecPRAI silvestres obtenidos mediante ajuste a dos modelos diferentes (M-M y Hill)

Modelo	PriA	PRAI
Michaelis-Menten	$K_M = 4.62438 \pm 1.51443$ (μM) $V_{\text{max}} = 11.50875 \pm 1.2720$ ($\mu\text{M/s}$)	$K_M = 4.4825 \pm 1.7114$ (μM) $V_{\text{max}} = 1.84 \pm 0.2163$ ($\mu\text{M/s}$)
Hill	$k = 4.7548 \pm 0.4530$ (μM) $n = 1.9765 \pm 0.3169$ $V_{\text{max}} = 10.4938 \pm 0.6078$ ($\mu\text{M/s}$)	$k = 4.9513 \pm 0.2699$ (μM) $n = 2.0657 \pm 0.2379$ $V_{\text{max}} = 1.6259 \pm 0.0571$ ($\mu\text{M/s}$)

Por otra parte, es importante destacar que antes de emplear tmIGPS se tenía IGPS de *E. coli* con la cual se realizaron ensayos en el espectrofotómetro detectando la aparición de InGP. Dicho ensayo espectrofotométrico presentó algunas dificultades (ver abajo) ya que ecIGPS es una enzima en extremo inestable y que se precipita casi inmediatamente después de ser purificada, por lo cual se enfocó toda la atención en el ensayo fluorimétrico. Sin embargo IGPS era indispensable aún para este ensayo por lo que se optó por una enzima menos inestable y más eficiente catalíticamente, tal es el caso de IGPS de *T. maritima*. Ésta enzima fue ensayada siguiendo la aparición de InGP a 278 nm (Fig. 19) cada vez que fue purificada para verificar que estuviera activa, sin embargo no se caracterizó en términos de sus parámetros catalíticos ya que solo se usó para evitar la inhibición por producto.

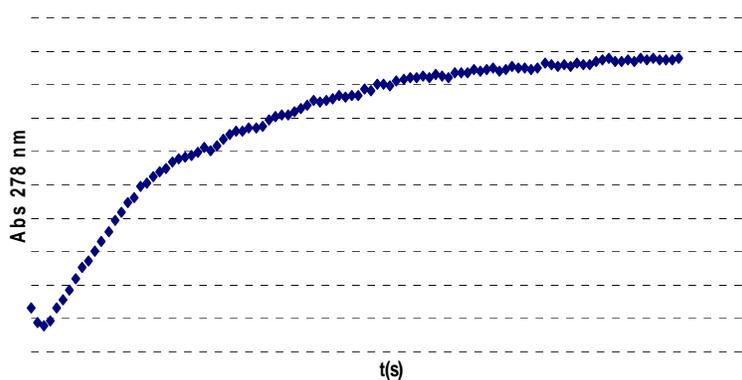
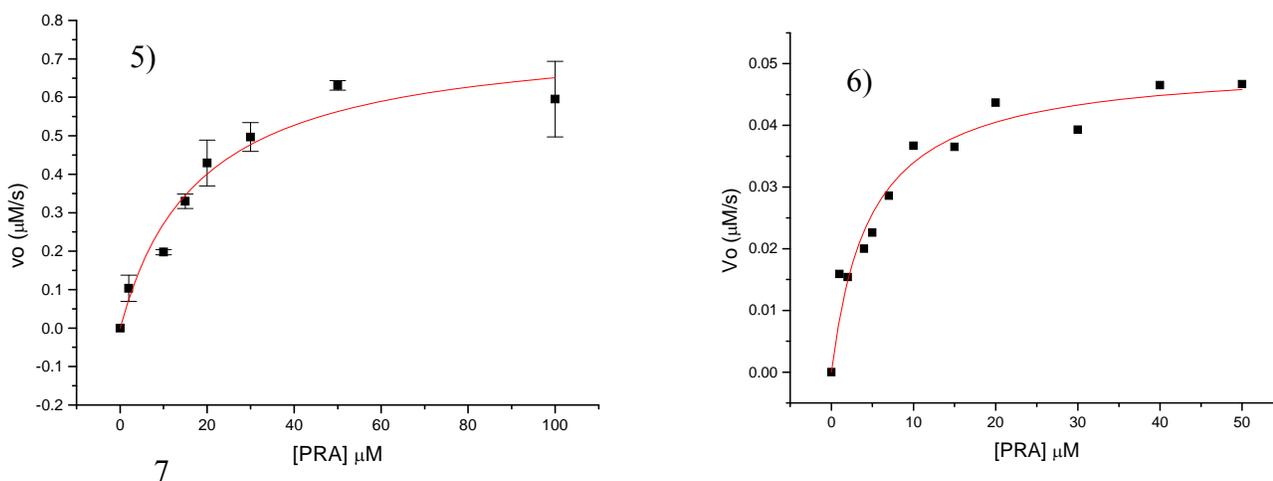


Figura 19. Progreso temporal de la reacción de tmIGPS monitoreando la formación de InGP a 280 nm.

Una vez purificadas y determinadas las concentraciones idóneas para el ensayo de las enzimas auxiliares que ofrecían mayores ventajas sobre las anteriores en muchos aspectos, se acoplaron para la obtención de un ensayo robusto y sensible en el fluorímetro para medir la actividad TrpF. Esto para el caso de la enzima silvestre de *E. coli* con la cual se presentó una reproducibilidad en ensayos por triplicado de enzimas (ecPRAI silvestre) purificadas independientemente en tres distintas ocasiones.



Gráficas 5-6 . Curvas de saturación de ecPRAI (5) y scPriA (6) (modelos silvestres) realizadas por triplicado y ajustadas al modelo de Michaelis-Menten mediante un ajuste no lineal usando el programa *MicroCal Origin* versión 5.0.

Tabla 8 Parámetros catalíticos de ecTrpF y scPriA silvestres obtenidos en tres experimentos independientes

			Temp (°C)	$K_{M(PRA)}$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/K_{M(PRA)}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
PRAI	<i>E. coli</i>	25		21.18 ± 5.3168	41.25 ± 5.3625	2
monofuncional						
PriA	<i>S. coelicolor</i>	25		4.99 ± 0.0781	3.38 ± 0.8551	0.67
(actividad TrpF)						

Además de la reproducibilidad del ensayo, es importante resaltar que los valores de K_M , se encuentran un orden de magnitud arriba de la reportada mientras que k_{cat} y k_{cat}/K_M (Tabla 8) se encuentran dentro del mismo orden de magnitud a las publicadas anteriormente (Sterner *et al.*, 1996), esto para el caso de ecPRAI. En el caso de scPriA la eficiencia catalítica sí disminuye un orden de magnitud en comparación al reporte anterior (Kuper *et al.*, 2005) dado que la k_{cat} es un orden de magnitud menor. Por otra parte el comportamiento sigmoideal antes mencionado ya no se volvió a presentar.

Al momento de realizar el ensayo con algunas mutantes de PRAI con inserciones de *loops* provenientes de PriA se presentó un evento que no había sido observado con las enzimas silvestres y consistió en que al agregar concentraciones de AA mayores a 100 μM , lo cual es necesario en el caso de mutantes que tuviesen una K_M mayor, la hidrólisis de PRA en un momento dado se vuelve más rápida que la actividad que pudiera tener la mutante y la cantidad de PRPP no es suficiente para “reciclar” el AA producto de dicha hidrólisis. Este evento se puede apreciar en la figura 20, en donde a una concentración de AA de 200 μM y PRPP de 500 μM , se estabiliza la señal mostrando que el AA se ha convertido todo a PRA (curva azul) posteriormente se agrega una mutante que se sabe posee una actividad TrpF nula *in vivo* (R139N curva rosa) y después de cierto tiempo no mayor a 16 minutos la hidrólisis de PRA se puede apreciar claramente con un aumento en la fluorescencia dado por la aparición nuevamente del AA que no puede ser re-convertido a PRA ya que no hay suficiente PRPP. Con estas observaciones se determinó agregar mayor cantidad de PRPP, observando un decremento esperado por la conversión de AA a PRA (curva amarilla). En lo sucesivo se adicionó en los ensayos un exceso 5 veces molar con respecto al AA agregado para evitar interferencias debidas a la hidrólisis de PRA.

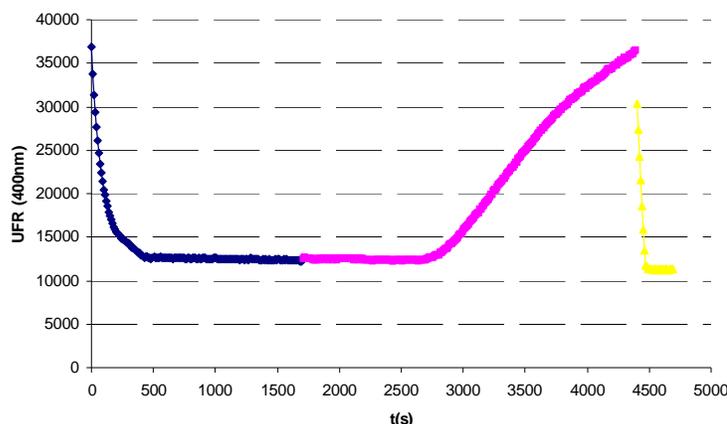


Figura 20 .Representación gráfica de la producción enzimática (puntos azules) e hidrólisis espontánea (puntos rosas) de PRA producido por yAnPRT a concentraciones mayores a 100 mM y 500 mM de PRPP. La curva amarilla representa nuevamente la producción de PRA al adicionar más PRPP a la reacción que ya contiene AA, producto de la hidrólisis espontánea de PRA.

También es de gran relevancia el hecho de que tanto ecPRAI como varias de sus mutantes, así como ecIGPS, se oxidan fácilmente (Patrick *et al.*, 2008) por lo que es requisito indispensable agregar β -mercaptoetanol durante la purificación, así como durante la dilución de la enzima que se hace para el ensayo.

4.4 Ensayo enzimático acoplado (*ssAnPRT-ecPRAI-ecIGPS*) en espectrofotómetro

Como se ha mencionado en los antecedentes del ensayo enzimático para PRAI, existe la posibilidad de realizar el ensayo acoplado una segunda enzima que consuma el producto de la reacción de PRAI, y siguiendo la aparición del producto de esta nueva enzima acoplada determinar los parámetros catalíticos de PRAI. Dicha enzima es IGPS de *E.coli*, cuyo producto InGP puede ser monitoreado a 278 nm por un método espectrofotométrico en lugar de fluorimétrico. Para emplear esta enzima, cuyo gen en *E.coli* se encuentra fusionado a PRAI y por tal motivo se recurre a una versión recombinante que lo expresa por separado (Eberhard *et al.*, 1995). En principio, esta nueva manera de ensayar la actividad de TrpF surge como una alternativa para aquellas variantes que, al tener una K_M mucho mayor a la silvestre, requieran una cantidad demasiado alta de sustrato para ser

saturadas y por tanto sea imposible de medir en el fluorímetro el progreso de la reacción (Patrick *et al.*, 2008).

Con esta premisa, se procedió a realizar el ensayo con las tres enzimas (ssAnPRT-ecPRAI-ecIGPS) para comprobar si se podían obtener los mismos parámetros reportados para la enzima silvestre mediante este nuevo método. Los resultados muestran curvas con tendencias iniciales diferentes para cada una de las distintas concentraciones de PRA (Anexo II) lo cual hacía difícil la obtención de velocidades iniciales a partir de la pendiente inicial.

Según los reportes de ensayos acoplados (Storer *et al.*, 1974), existe un lapso de tiempo en el que la velocidad de formación del producto final (InGP en este caso) no es lineal, denominado tiempo lag de la reacción. Después de dicho periodo se presenta una aparición lineal del producto que se va monitoreando, y en estas circunstancias el producto intermedio (CdRP) esta en una concentración constante ya que la velocidad de producción es igual a la de desaparición (Fig. 21). El tiempo lag esta influenciado tanto por la cantidad de enzima acoplante (IGPS), como por la constante de Michaelis que tiene dicha enzima para CdRP (el producto de PRAI). En este caso la K_M de ecIGPS es $0.47 \mu\text{M}$, es decir, diez veces menor que la de PRAI, con lo cual se puede decir que ecIGPS es una enzima eficiente a bajas concentraciones de CdRP. La cantidad utilizada de enzima en el reporte de Patrick y col. 2008 es de $2 \mu\text{M}$, y en este caso la cantidad fue $0.1 \mu\text{M}$. Es posible entonces, que la cantidad de IGPS sea tan poca que la relación entre la velocidad de ésta y la velocidad de PRAI no se relacione de manera que permita un ensayo acoplado válido.

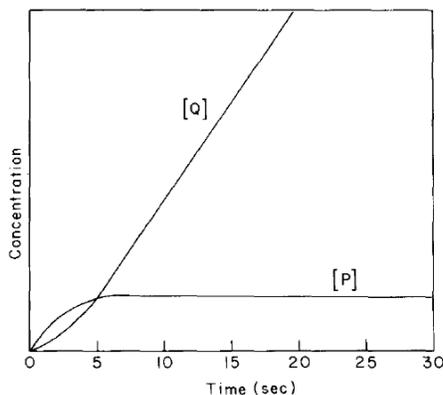
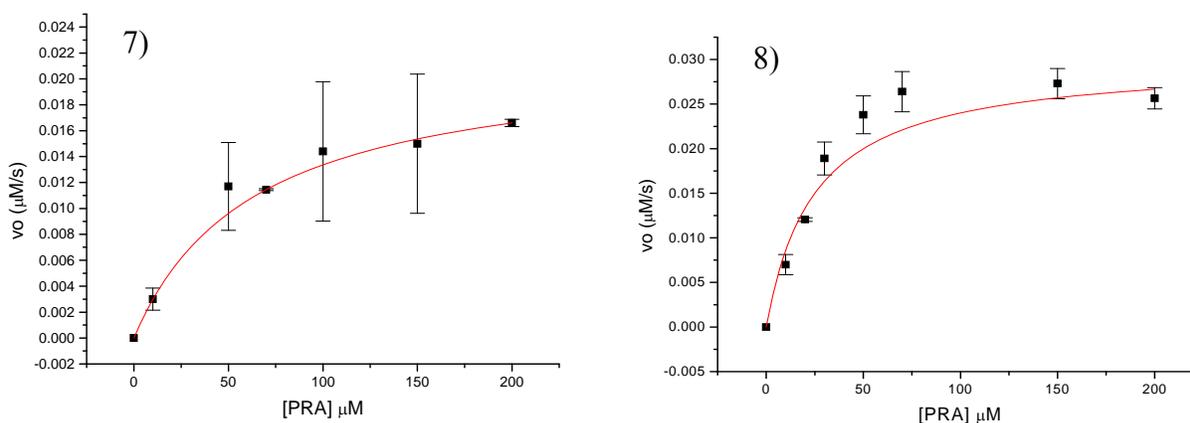


Figura 21. Representación del producto intermedio P (CdRP, en el caso de PRAI) y el producto final Q (InGP en el caso de IGPS) como función del tiempo. (Rudolph *et al.*, 1979).

Las observaciones que se tienen de este método pueden sugerir que, se esta teniendo un tiempo lag grande que debería ser disminuido con el aumento de la concentración de IGPS, sin embargo al ser ésta una enzima altamente agregable, al intentar concentrarla se forman agregados visibles, los cuales a su vez pueden interferir en las mediciones ya que se trata de un ensayo óptico sensible a la turbidez del sistema y se tiene una mezcla compleja.

4.5 Caracterización cinética de mutantes

La determinación de los parámetros cinéticos de las mutantes seleccionadas (Tabla 9) (ecPRAI con *loop* 1 de scPriA en posición 6 y diferentes residuos en la bisagras) dió como resultado una K_M muy similar (mismo orden de magnitud) a la de la enzima silvestre (ecPRAI); sin embargo, la constante catalítica k_{cat} es dos ordenes de magnitud menor a la obtenida para ecPRAI afectando con esto de manera importante la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) de dichas mutantes. En principio estos resultados sugieren que estas mutantes tiene una afinidad por PRA similar a la de la enzima silvestre pero que dicho sustrato no se esta uniendo o posicionando de manera adecuada para llevar a cabo la catálisis tan eficiente como ecPRAI silvestre.



Gráficas 7-8. Curvas de saturación de Mutante 4 y 5 por triplicado ajustadas al modelo no lineal de Michaelis-Menten usando el programa *MicroCal Origin* versión 5.0.

Tabla 9 Parámetros catalíticos de mutantes 4 y 5 obtenidos en tres experimentos independientes

	Temp (°C)	$K_{M(PRA)}$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/K_{M(PRA)}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Mutante 4	25	63.8±1.42	0.04±0.00004	6.27×10 ⁻⁴
Mutante 5	25	32.5±4.38	0.01±0.004	3.08×10 ⁻⁴

Sin embargo, a ambas mutantes les toma prácticamente el mismo tiempo complementar la actividad TrpF *in vivo* que a la enzima silvestre, lo cual significa que sí hay catálisis al menos para generar el triptófano necesario que le permite a la célula carente del gen *trpF* crecer con una diferencia de tres horas en comparación con la enzima silvestre en medio mínimo sólido. Se realizaron también cinéticas de crecimiento en medio M9 líquido para ver si existía alguna correlación entre las velocidades de crecimiento y los parámetros catalíticos obtenidos, y lo que se observó fue que la mutante 5 tiene una velocidad de crecimiento muy comparable con la de la enzima silvestre, incluso mayor. Por su parte la mutante 4 crece a un ritmo un poco menor, sin embargo al momento de ser comparada con la velocidad de complementación de PriA, esta enzima es la más lenta de todas (Fig. 22A).

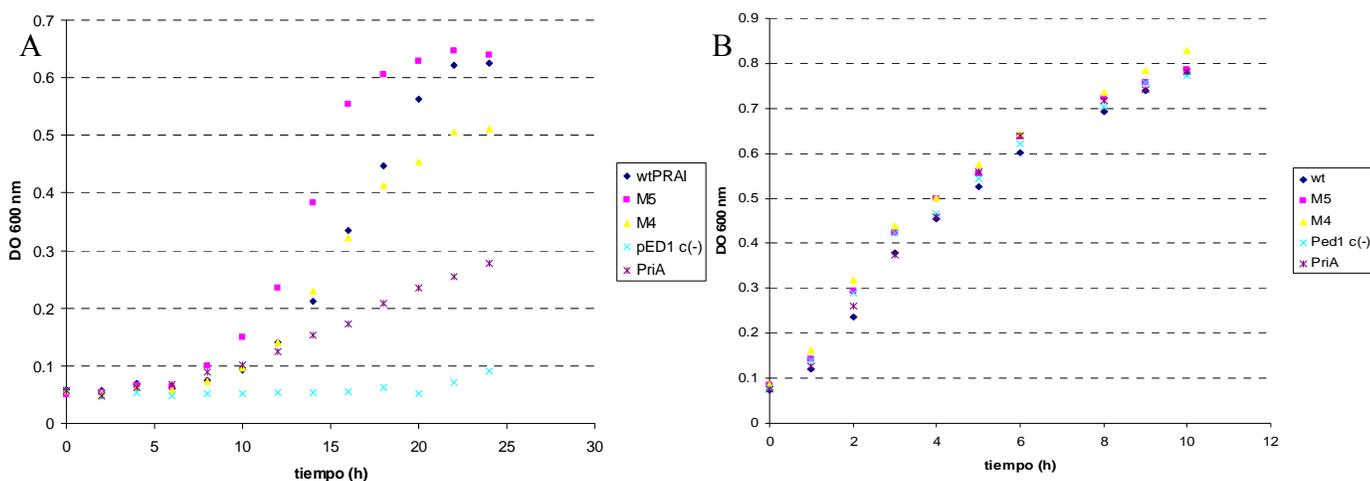


Figura 22. A) Curvas de crecimiento de la cepa JM101 $\Delta trpF$ en medio M9 líquido transformadas con wtPRAI, M5, M4, y PriA. B) Curvas de crecimiento en LB/Amp.

Estos resultados de parámetros catalíticos y cinéticos de crecimiento muestran claramente que no se puede establecer una correlación directa entre las dos propiedades, puesto que las mutantes aún con actividades *in vitro* muy bajas tienen actividad *in vivo* suficiente para satisfacer las necesidades metabólicas de la célula. Por otra parte, esta eficiencia catalítica menor a la de la enzima silvestre puede estar compensada con la sobreexpresión y la solubilidad de estas mutantes dentro de la célula: según Patrick & Matsumura (2008) un evento de sobreexpresión de una mutante con una muy baja actividad *in vitro* puede dar lugar a una similitud en la velocidad de formación de una colonia de una cepa auxótrofa para dicha actividad. De hecho, han comprobado cuantitativamente que una actividad marginal de alguna enzima puede mejorar significativamente la adaptación relativa de un organismo. De igual forma se tienen presentes los trabajos realizados por Neuenschwander y col. (2007) en los cuales hacen ver que el crecimiento de cepas auxótrofas como método de selección para discriminar entre enzimas mutantes con mayor o menor actividad son una medida indirecta y en cierta forma imperfecta para medir la actividad catalítica. En su ejemplo específico de la corismato mutasa ellos proponen el uso de un promotor altamente regulado, además de la introducción de un sitio muy susceptible a la degradación que va unido a la proteína, manteniendo con esto muy bajas concentraciones de dicha enzima dentro de la célula lo cual les permite seleccionar a las variantes más interesantes, es decir las que tienen mejor actividad *in vitro* para seguir mejorando sus parámetros catalíticos por evolución dirigida.

En cuanto a los cambios realizados en dichas mutantes, se puede decir que pese a algunas similitudes entre los elementos funcionales intercambiados (formación de tapas del sitio activo en sus respectivas enzimas y flexibilidad) poseen diferencias tales como falta de relación estructural, diferencia en tamaño y a nivel de secuencia sólo poseen un motivo conservado (GXXG) y estas diferencias pueden estar jugando un papel muy importante en la catálisis reflejado en una k_{cat} trescientas veces más baja. En cuanto a los residuos que forman las bisagras se ha hipotetizado que pudieran ser de gran importancia en la dinámica del *loop* o bien en la solubilidad de la proteína. Al respecto hemos podido observar al realizar ensayos de solubilidad de estas mutantes que sus comportamientos son distintos entre sí, puesto que la mutante 4 es mucho menos soluble que la mutante 5 (Tabla 5) cuya

solubilidad es muy comparable con la de la enzima silvestre. Además de que la mutante 4 presenta serios problemas al momento de ser purificada por afinidad a la columna de níquel como se puede observar en los geles de la Tabla 5.

Tabla 10 Residuos que forman las bisagras de las mutantes de PRAI con loop 1 de PriA en la posición 6

Enzima	Residuos en las bisagras
ecPRAIwt	<u>N</u> -loop6PRAI- <u>W</u>
Mutante 4	<u>L</u> -loop1PriA- <u>R</u>
Mutante 5	<u>V</u> -loop1PriA- <u>W</u>

Las diferencias en los residuos de las bisagras de la mutante 4 con respecto a la 5 como se puede observar en la Tabla 8 están dadas principalmente por el residuo que esta después del loop insertado (R y W) ya que el primer residuo de ambas bisagras (L y V) poseen características similares. Al compararlas con la silvestre, las dos mutantes varían la primera posición ya que han incorporado residuos muy diferentes al de la silvestre en cuanto a tamaño de la cadena lateral e hidrofobicidad. Para la segunda posición la mutante 4 es la única que presenta diferencia ya que tiene arginina -un residuo básico- mientras que la mutante 5 fijó el mismo residuo que ecPRAI silvestre -triptófano- en esa posición. En este sentido cobra fuerza la hipótesis de que los residuos que forman las bisagras están interfiriendo con la solubilidad de la enzima y más certeramente el residuo que forma la bisagra después del *loop*.

4.6 Actividades específicas de enzimas quiméricas

En cuanto a las actividades específicas de algunas de las variantes (Tabla 10), éstas se obtendrían a partir de extractos totales. Las variantes seleccionadas se encuentran clonadas en un plásmido (pDAN5) que presenta cierta dificultad para la sobreexpresión de estas proteínas aún cuando es inducido con IPTG, por lo que no fue posible ver una clara

sobreexpresión en un gel SDS-PAGE ni en la fracción insoluble ni en la soluble para la mayoría de las proteínas que se tenía pensado caracterizar. A pesar de ello, algunas complementan la actividad TrpF en la cepa auxótrofa para triptófano. Las únicas excepciones fueron la enzima silvestre y de una de las mutantes (M2), que pueden ser apreciadas en el gel de acrilamida (Fig. 23A) y al ser ensayadas *in vitro* son las únicas que presentan actividad en el ensayo fluorimétrico (Fig. 23B).

Utilizando los reactivos y protocolos desarrollados en este trabajo, Humberto Flores, miembro del laboratorio que construyó dichas mutantes (Tabla 11) ha realizado ensayos de actividad específica así como complementación y cinéticas de crecimiento de la cepa auxótrofa para triptófano, y sus observaciones muestran claramente que ecPRAI silvestre complementa más rápido que el resto de las enzimas, seguida por PRAI consenso que lo hace prácticamente igual que M2 y la cinética de crecimiento más lenta la presenta M1. Sin embargo, en los ensayos realizados con los extractos solubles no se logra ver actividad de esta última enzima mutante (M1). Pese a que estos resultados por el momento son sólo cualitativos, se muestra el mismo fenómeno planteado en el apartado anterior donde la complementación de la actividad en la cepa auxótrofa no se correlaciona bien con la actividad mostrada *in vitro* ya que, en el caso concreto de PRAI consenso que sí complementa la función ésta no presenta actividad catalítica en estas condiciones del ensayo.

Lo que se destaca en los experimentos realizados con extractos totales es la importancia de tener proteína soluble, lo cual a su vez se ve afectado por factores que van desde tiempo y temperatura de inducción con IPTG, hasta la sonicación, así como las propiedades de cada proteína y fenómenos que se llevan a cabo dentro de la célula.

Tabla 11 Descripción de las mutantes ensayadas mediante actividad específica de los extractos totales

ENZIMA	DESCRIPCIÓN
Ped1 C(-) Control negativo	primera mitad PRAI _{wt} _LoxP_Anticuerpo
wtPRAI	PRAI silvestre de <i>E. coli</i>
wtPRAILOxP $\beta 1\alpha 4$ PRAI _{wt} _LoxP_ $\beta 5\alpha 8$ PRAI _{wt}	PRAI silvestre de <i>E. coli</i> con inserción de un sitio LoxP
ConsPRAI $\beta 1\alpha 4$ PRAI _{cons} _ $\beta 5\alpha 8$ PRAI _{cons}	PRAI consenso
consPRAILOxP $\beta 1\alpha 4$ PRAI _{cons} _LoxP_ $\beta 5\alpha 8$ PRAI _{cons}	PRAI consenso con inserción de un sitio LoxP
$\beta 1\alpha 4$ PRAI _{wt} _LoxP_ $\beta 5\alpha 8$ PRAI _{cons}	Primera mitad PRAI silvestre <i>E. coli</i> unida mediante un LoxP a la segunda mitad PRAI consenso
$\beta 1\alpha 4$ PRAI _{cons} _LoxP_ $\beta 5\alpha 8$ PRAI _{wt}	Primera mitad PRAI consenso unida mediante un LoxP a la segunda mitad PRAI silvestre <i>E. coli</i>
consPRAILOxPM1	PRAI consenso mutaciones S127W, N150I
consPRAILOxPM2	PRAI consenso mutaciones A127V, N150I

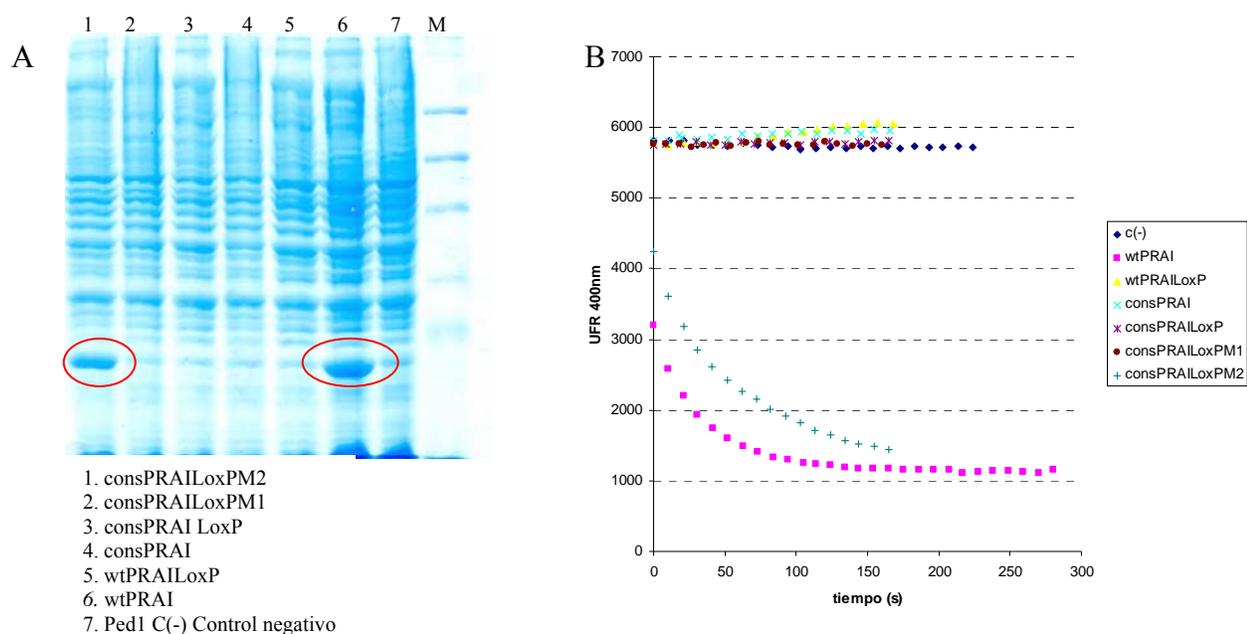


Figura 23. A) Gel SDS-PAGE con los extractos totales de las diferentes mutantes ensayadas para la obtención de sus actividades específicas. B) Curvas de actividad de las mutantes seleccionadas seguidas por desaparición de fluorescencia debida al consumo de PRA.

5. CONCLUSIONES

El reto enorme que implica mimetizar a la evolución natural a nivel laboratorio se ha abordado de distintas maneras, y en nuestro caso en particular se hizo tomando como modelo fosforribosil antranilato isomerasa dando como resultado enzimas mutantes que sirven como punto de partida para nuevos experimentos. Sin embargo, la caracterización cinética de dichas mutantes no había sido posible, por lo que no se había logrado redondear el análisis *in vivo* que se ha venido realizando. En este trabajo se presentan a detalle los requerimientos y complejidad del ensayo enzimático así como su utilización para caracterizar algunas mutantes obtenidas mediante intercambio de asas, dando como resultado parámetros catalíticos primero para las enzimas silvestres ecPRAI y scPriA que constituyen un referente fundamental y son comparables con los reportados en la literatura, así como los parámetros para dos mutantes con el asa 1 de PriA dentro del plegamiento de PRAI en la posición 6 con distintas bisagras. Dichos parámetros muestran similitud entre sí en términos de eficiencia catalítica, lo cual se explica bien con el hecho de que ambas complementan la actividad TrpF en un tiempo similar; sin embargo la eficiencia difiere en cuatro órdenes de magnitud con respecto a la enzima silvestre, aún cuando la cinética de crecimiento de la cepa auxótrofa es igual para tanto para las mutantes como para la silvestre. Con estas observaciones se puede concluir que los cambios efectuados en la enzima están afectando los parámetros catalíticos de la enzima, principalmente la constante catalítica, aunque dichas mutantes llevan a cabo una catálisis suficiente *in vivo*. Asimismo se puede comprobar que las interconexiones entre los residuos o elementos (en este caso los *loops*) involucrados en el reconocimiento del sustrato deben proveer la fijación necesaria para que dicho sustrato se posicione dentro del sitio activo y que no poseen una función discreta, ya que los problemas derivados de interacciones con el sustrato se reflejan tanto en el recambio catalítico como en la eficiencia de la enzima.

Éstos resultados, aunados a los observados en los experimentos con los extractos totales de mutantes que tienen la capacidad de complementación de la actividad TrpF *in vivo* similar a la enzima silvestre y actividad *in vitro* muy baja, resaltan la importancia de eventos o mutaciones que dan lugar a la sobreexpresión de proteínas, que si bien no son altamente

eficientes en términos de sus parámetros catalíticos pueden llevar a cabo reacciones químicas dentro de una célula que sufre un desbalance metabólico, como sería el caso de una cepa auxótrofa. Dicha sobreexpresión se comprobó y controló mediante el uso de promotores altamente regulables.

Con respecto al ensayo para medir la actividad TrpF, se puede concluir que una vez atenuados los problemas de la hidrólisis del sustrato produciéndolo *in situ* y el de la inhibición por producto usando tmIGPS, existen un par de puntos en los que se podría trabajar, por ejemplo en algún momento se intentó deletar el gen que codifica para PRAI dentro de la cepa usada para la expresión de la mayoría de las mutantes, esto con el fin de obtener un sistema de expresión que no diera lugar a contaminación de la enzima silvestre al purificar las enzimas mutantes. Por otra parte se puede probar la expresión de las proteínas que están en un plásmido (pQE-I) que no está bajo el promotor T7 en la cepa usada para los ensayos de complementación que no tiene el gen *trpF* para descartar una posible contaminación.

REFERENCIAS

- Arnold F. 1998 “Desing by directed evolution” *Acc. Chem. Res.* 31:125-131.
- Baba T., Ara T., 2006 “Construction of Escherichia coli K-12 in frame single-gene knockout mutants: the KEIO collection” *Mol Syst Biol.*
- Banner D. W., 1975 “Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data.” *Nature* 255(5510):609-14.
- Barona F., Hodgson D., 2003 “Ocurrence of a putative ancient-like isomerase involved in histidine and tryptophan biosynthesis” *EMBO rep* 4:296-300.
- Chen K., Arnold FH. ,1993 “Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide
- Chatterjee R., Yuan L., 2006 “Directed evolution of metabolic pathways” *TRENDS biot.* 24:28-28.
- Creighton T. E. 1968 “The nonenzymatic preparation in solution of N-(5'-phosphoribosyl) anthranilic acid, an intermediate in tryptophan biosynthesis” *J Biol. Chem.* 21:5605-5609.
- Eberhard M., Pflugfelder T. 1995 “Indoleglycerol phosphate syntase-phosphoribosyl antranilate isomerase: comparison of the bifunctional enzyme from Escherichi coli with engineered monofuncional domains” *Biochemistry.* 34:5419-5428.
- Eisenthal R. 2002 “Enzyme assays” pp. 29-38 IRL Press. Oxford
- Gerlt J., Babbitt P. 2004 “Divergent evolution in the enolase superfamily: the interplay of mechanism and specificity” *Arch. Biochem. Biophys.* 433:59-70.
- Glasner M., Gerlt J.A., Babbitt P. 2007 “Mechanisms of protein evolution and their applicatios to protein engineering” *Adv. Enz* 75:193-239
- Harding W. M. 1969 “Relationships between stability of threonine deaminase and its apparent kinetics” *Arch. Biochem. Biophys.* 129:57-61
- Hee-sung Park., 2006 “Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold” *Science* 311:535-538.

- Hommel U., Eberhard M. Kirschner K. 1995 “Phosphoribosyl antranilate isomerase catalyzes a reversible amidic reaction” *Biochemistry* 34:5429-5439.
- Ivens A., Myans O. Szadkowsky H. 2001 “Purification, characterization and crystallization of thermostable anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*” *Eur. J. Biochem.* 268:2246-225.
- Kerner M. J., Naylor D. J., 2005 “Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*” *Cell* 122:209-220
- Kirschner K., Szadkowski H, Jardetzky T. S. 1987 “Phosphorybosylanthranilate isomerase-indoleglycerol-phosphate synthase from *Escherichia coli*” *Methods Enzymol.* 142:386-397
- Kinch L., Grishin N. 2002 “Evolution of protein structures and functions” *Cur. Op. Struct. Biol.* 12:400-408.
- Kuper J., Doenges C., Wilmanns M., 2005. “Two fold repeated ($\beta\alpha$)₄ half barrels may provide a molecular tool for dual substrate specificity” *EMBO rep* 6:134-139
- Lang D., Thoma R., 2002 “Structural evidence for evolution of the β/α barrel scaffold by gene duplication and fusion” *Science* 289:1546-1550.
- Lee C., Goodfellow C. 2005 “The crystal structure of TrpD, a metabolic enzyme essential for lung colonization by *Micobacterium tuberculosis*, in complex with its substrate phosphoribosylpyrophosphate” *J. Mol. Biol.* 355:784-797.
- Marino M., Deuss M., Svergun D. 2006 “Structural and mutational analysis of substrate complexation by anthranilate phosphoribosyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*” *J. Biol. Chem.* 30:21410-21421.
- Matsuura T., Yomo T. 2006 “In vitro evolution of proteins” *J. Biosci. Bioeng.* 101:449-446.
- Miroux B., Walker J. E., 1996 “Over-production of proteins in *Escherichia coli* : mutant host that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels” *J. Mol. Biol.* 260:289-298.
- Nagano N., Orengo CA. Thornton JM. 2002 “One fold many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions” *J. Mol. Biol.* 30:741-765.

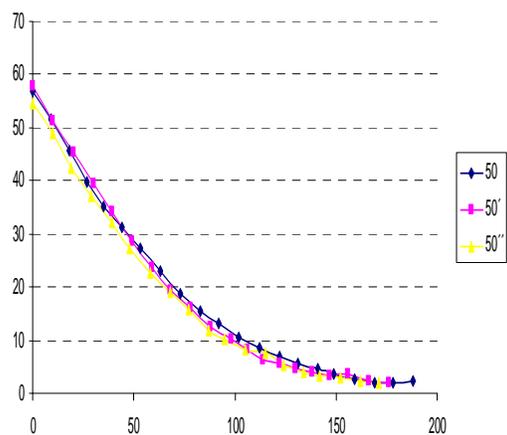
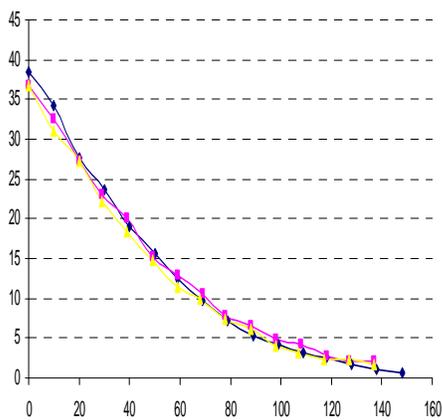
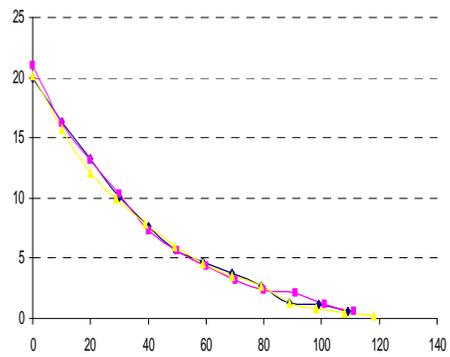
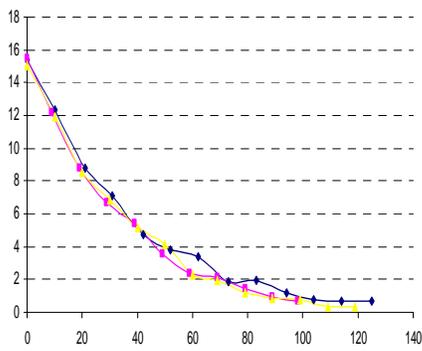
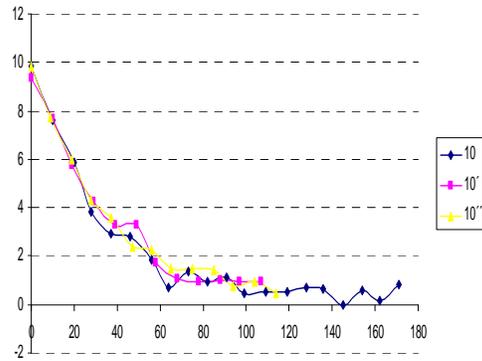
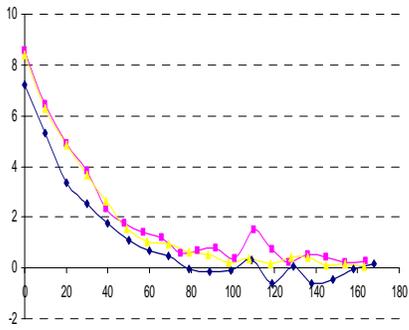
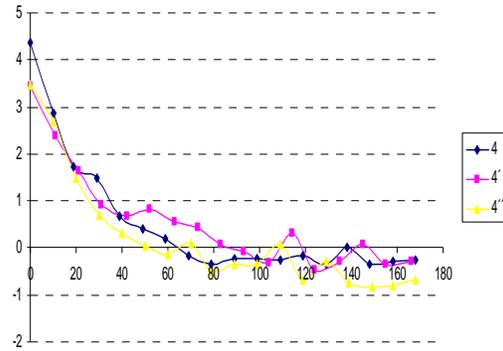
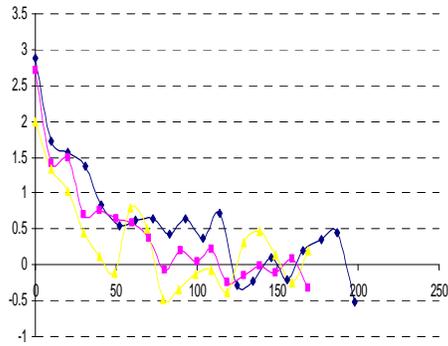
- Neuenschwander M. Butz M. 2007 “A simple selection strategy for evolving highly efficient enzymes” *Nat Biotechnol.* 23:1145-1147.
- Ochoa-Leyva A., Soberón X., 2009 “Protein design through systematic catalytic loop exchange in the (beta/alpha)(8) Fold” *J. Mol. Biol.*
- Pace C. N., Vajdos F. 1995 “How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein” *Protein Sci* 4:2411-2423
- Patrick W., Blackburn J. 2005 “In vitro selection and characterization of a stable subdomain of phosphoribosylanthranilate isomerase” *FEBS J.* 272 :3684–3697
- Patrick W., Matsumura I., 2008 “A study in molecular contingency: glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase is a promiscuous and evolvable phosphoribosylanthranilate isomerase” *J. Mol. Biol*
- Price N. “Fundamentals of enzymology” 2a. Edición 1996 pp. 136-247
- Readon, D. Farber, G. 1995 “The structure and evolution of a ($\beta\alpha$)₈ barrel proteins” *FEBS J.* 9:497-503.
- Saab-Rincón G., Mancera E., Montero-Morán G., Sánchez F., Soberón X. 2005 “Generation of variability by in vivo recombination of halves of a ($\beta\alpha$)₈ barrel protein” *Biomol. Eng.* 22:113-120.
- Schneider B., Knöchel T., “Role of the N-terminal extension of the ($\beta\alpha$)₈ barrel enzyme indole-3-glycerol phosphate synthase for its fold, stability, and catalytic activity” 2005 *Biochemistry* 44:16405-16412.
- Soberón, X. Fuentes-Gallego, P. Saab-Rincón, G. “In vivo fragment complementation of a (beta/alpha)(8) barrel protein: generation of variability by recombination” 2004. *FEBS Lett* 560:167-172.
- 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., Klememann G., Szadkowski H. “Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer*” 1996 *Protein Sci* 5: 2000-2008
- Tao H., Cornish V. W. 2002 “Milestones in directed enzyme evolution” *Cur Op. Chem Biol.* 6:858-864

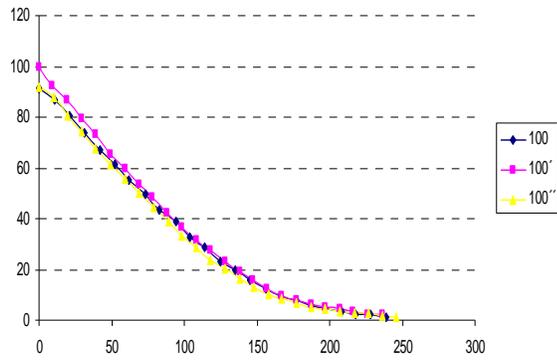
- Yuan, L. Kurek I. 2005 “Laboratory-directed protein evolution” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69 373–392

Tabla AI-2 Cepas empleadas para la expresión de las distintas enzimas empleadas en el ensayo enzimático de TrpF

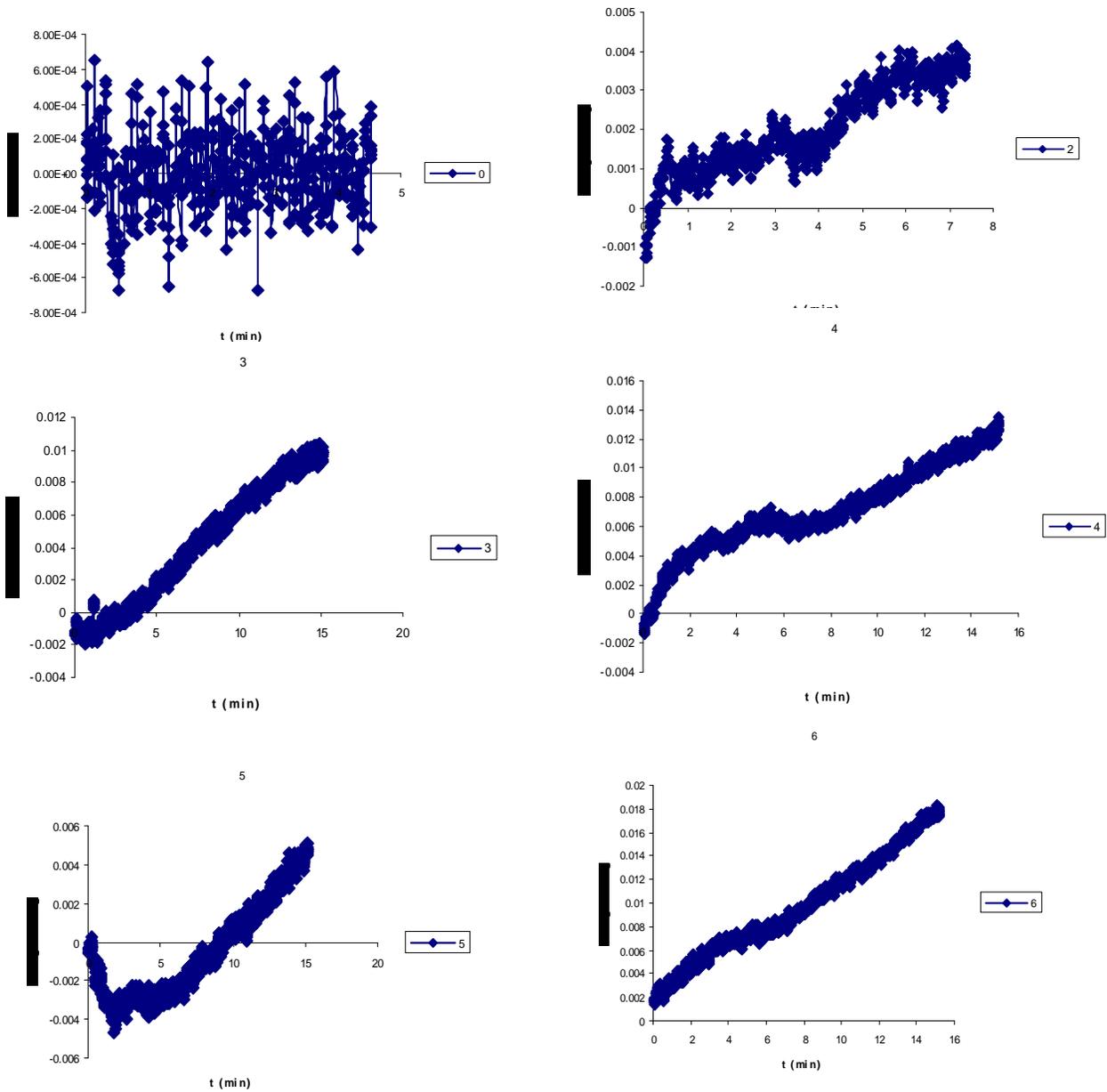
CEPA	GENOTIPO
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)].(Stratagene)
MC1061 (PREP4)	araD139 Δ(ara, leu)7697, ΔlacX74, galU, galK, hsdR, strA
M15 (PREP4)	Derivada de E. coli K12 NaIS, StrS, RifS, Thi-, Lac-, Ara+, Gal+, Mtl-, F-, RecA+, Uvr+, Lon+ (Qiagen)
DH5α	F' Phi80dlacZ DeltaM15 Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+)phoA supE44 lambda- thi-1
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻)
ROSSETA 2	Derivada de BL21, usada para la expresión de proteínas de eucariotes con uso de codones raros, contiene el plásmido que le confiere resistencia a cloramfenicol pRARE.
C41, C41_pRIL1, C41_pRARE, C41_pGroEL/ES	
C43, C41_pRIL1, C41_pRARE	

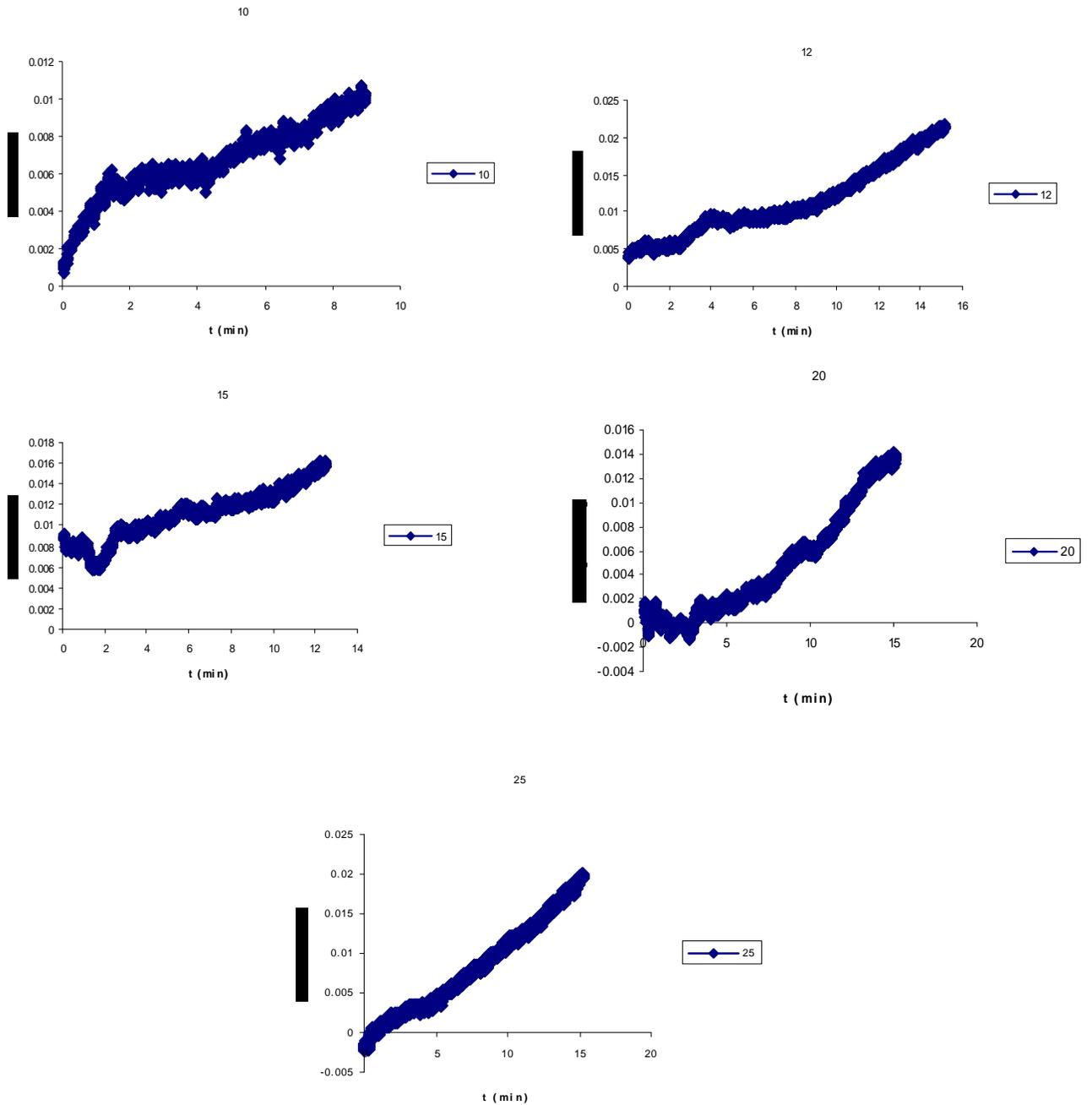
ANEXO II Cursos temporales de reacción de TrnF silvestre v mutantes



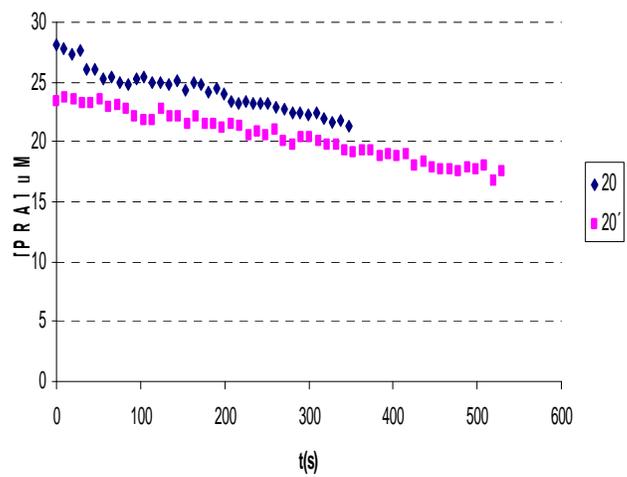
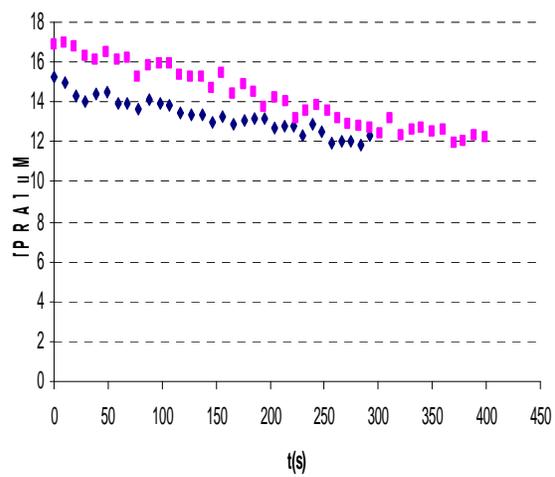
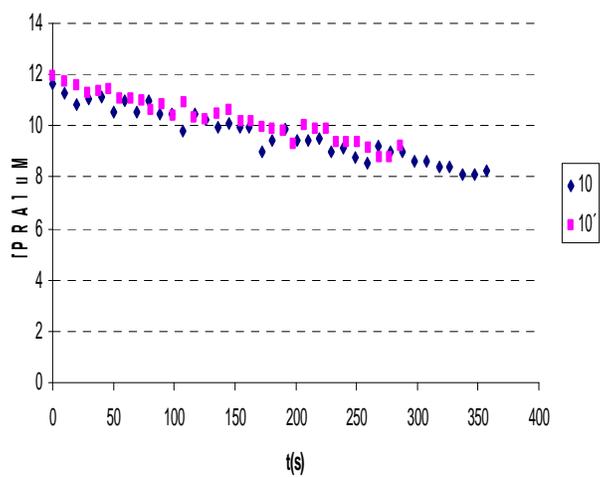
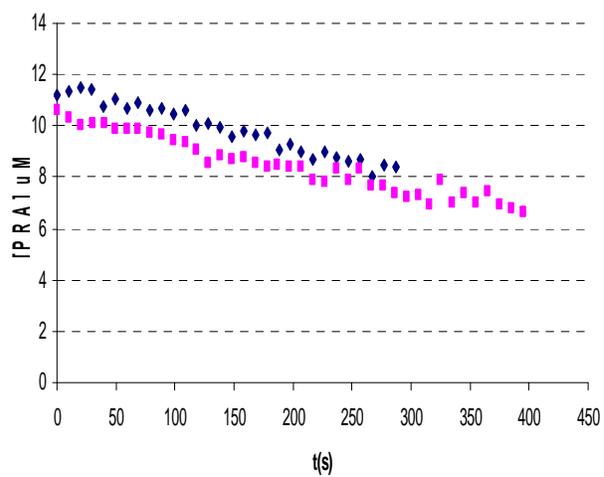
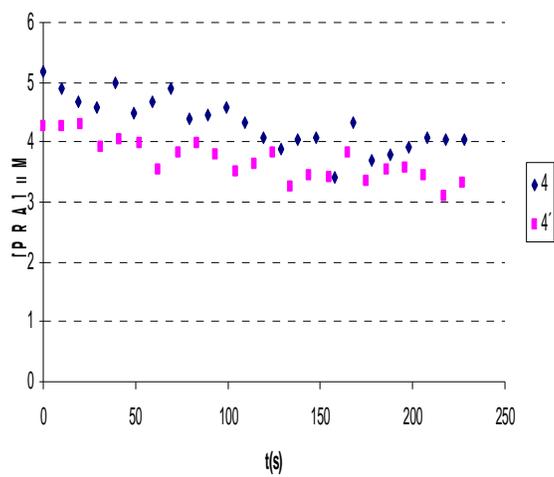
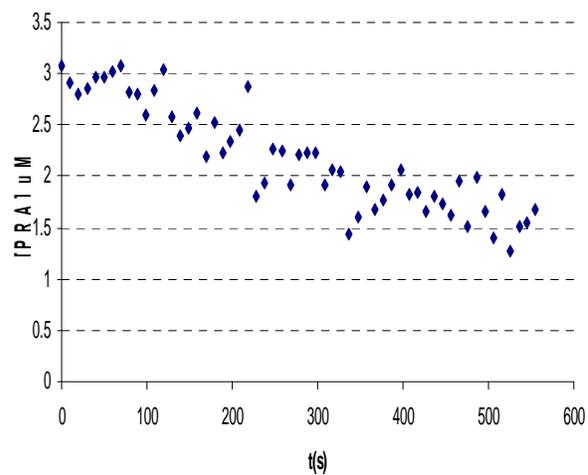


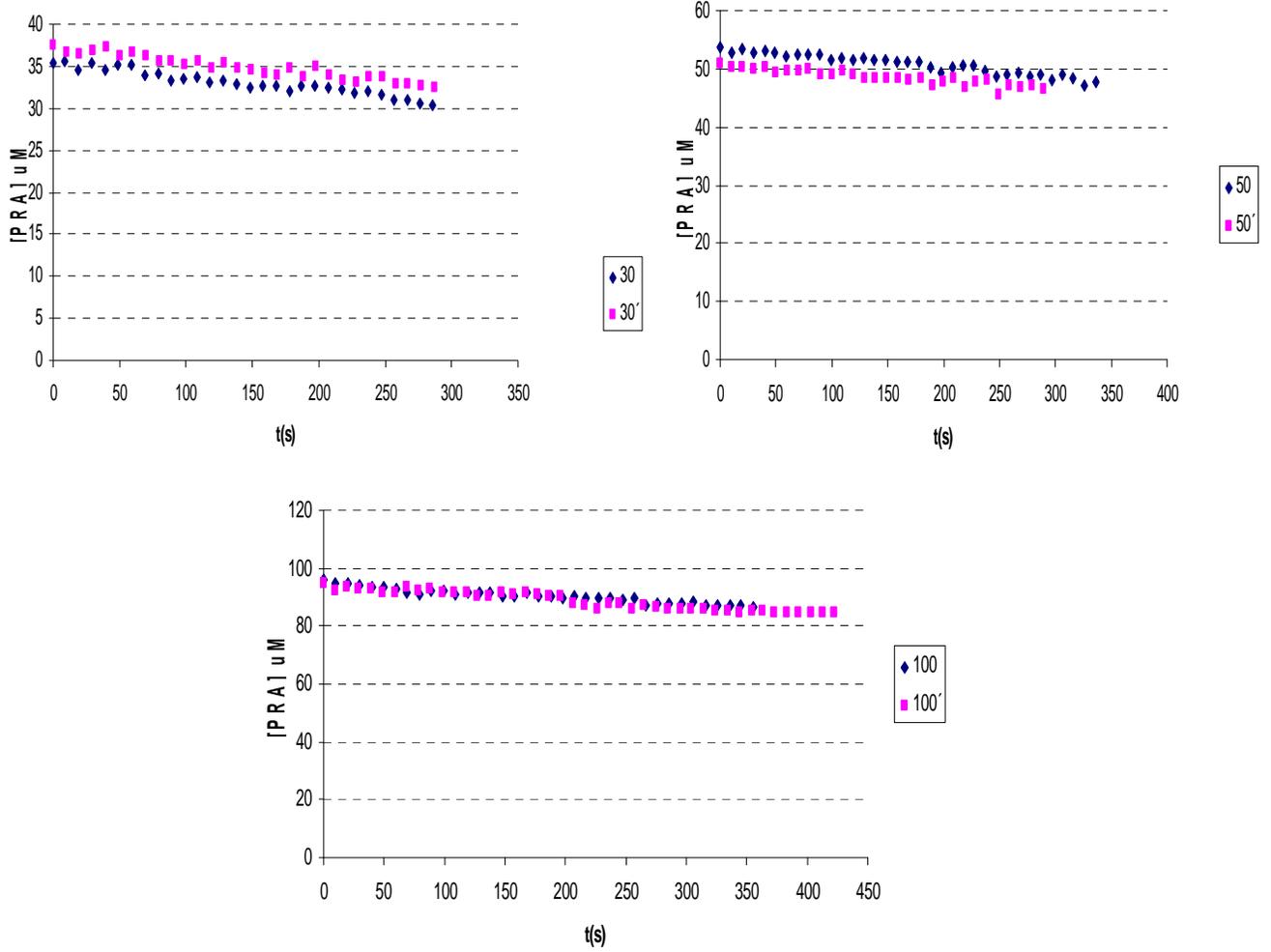
Gráficas AII-1. Progresos temporales de la reacción de ecTrpF silvestre a distintas concentraciones de PRA (0-100 micromolar) monitoreadas por la desaparición de sustrato (fluorescencia: excitación 310 nm, emisión 400 nm)



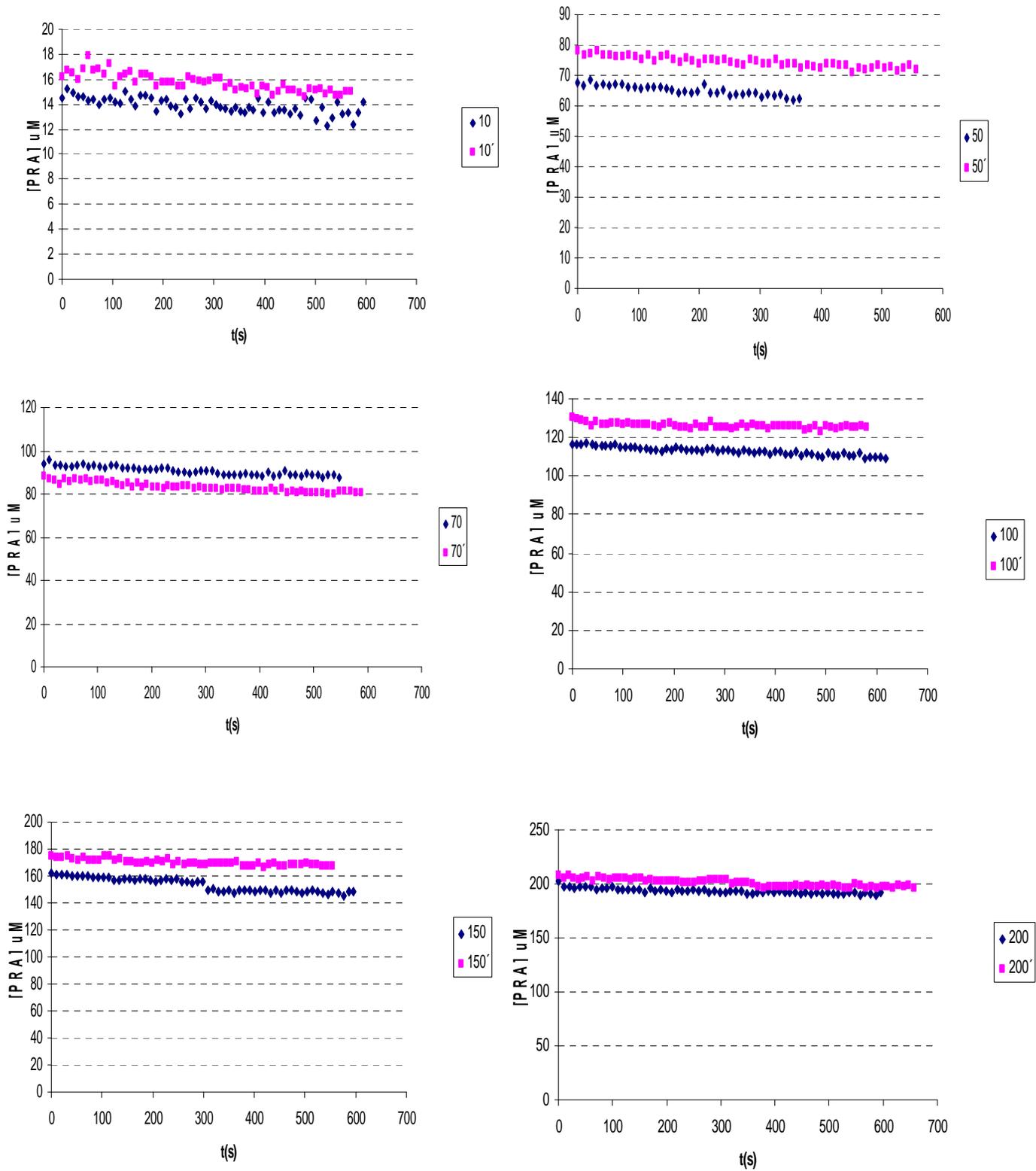


Gráficas AII-2 . Progresos temporales de la reacción de ecTrpF silvestre acoplada a la reacción de ecIGPS a distintas concentraciones de PRA (0-25 micromolar) monitoreadas por la aparición de IGP (absorbancia a 278 nm)

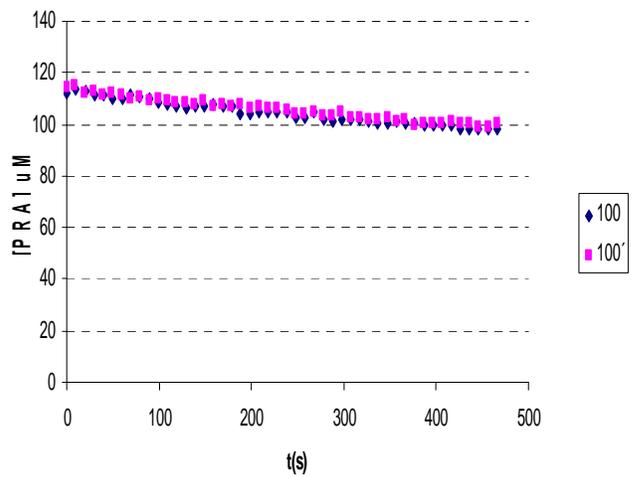
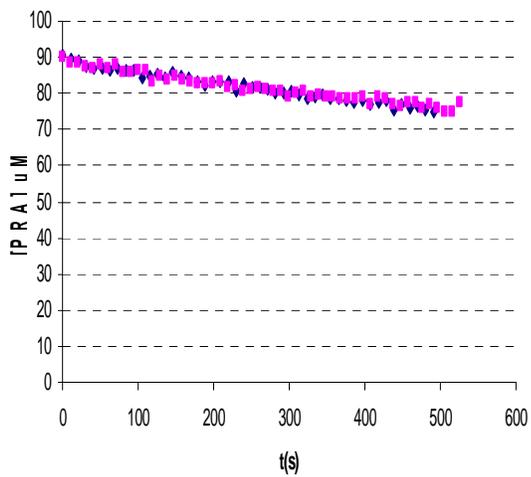
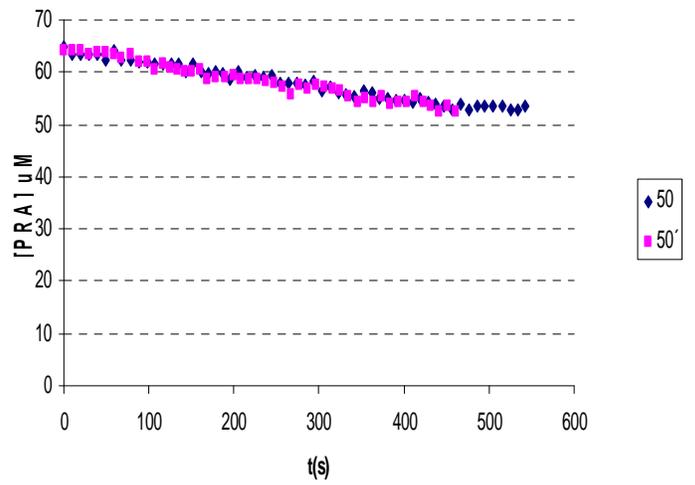
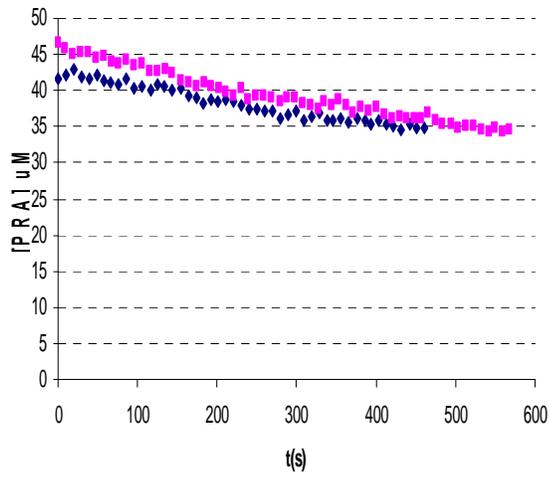
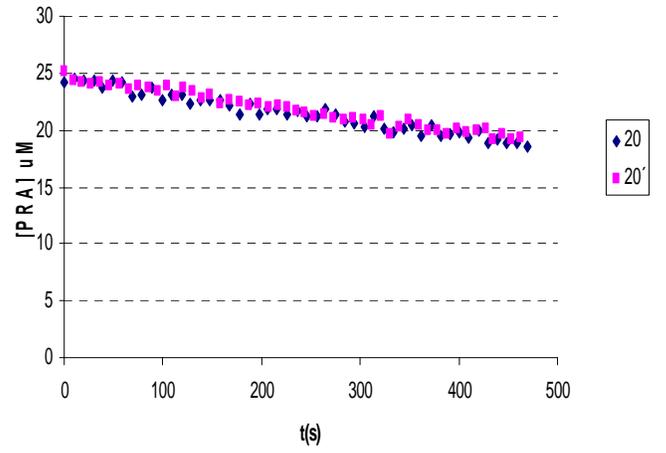
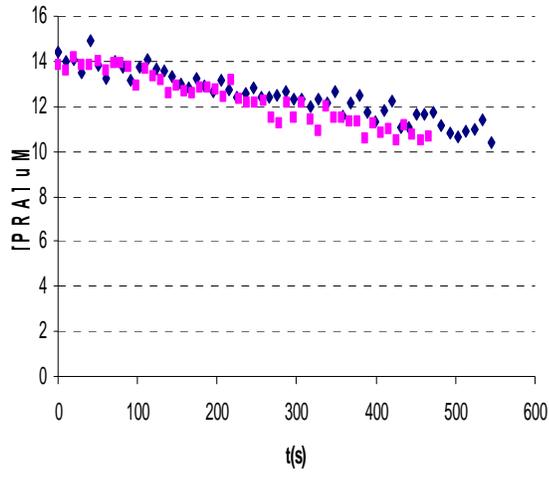


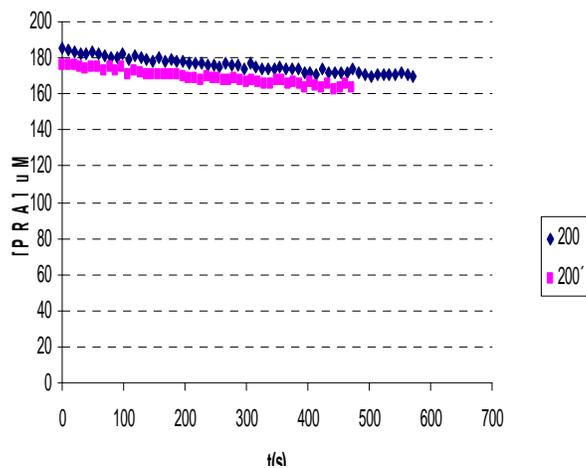
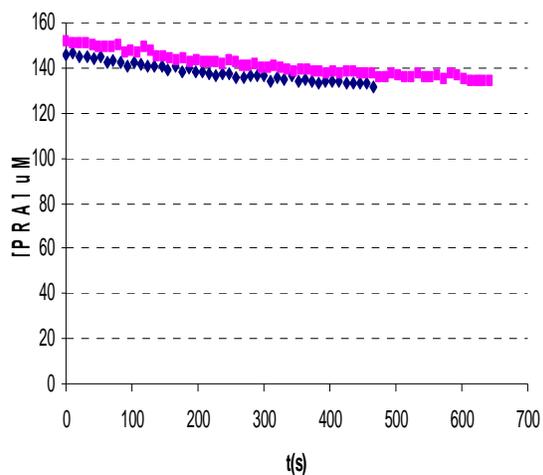


Gráficas AII-3 . Progresos temporales de la reacción scPriA a distintas concentraciones de PRA (0-100 micromolar) monitoreadas por la desaparición de sustrato (fluorescencia: excitación 310 nm, emisión 400 nm)



Gráficas AII-4 . Progresos temporales de la reacción de la mutante 4 a distintas concentraciones de PRA (0-200 micromolar) monitoreadas por la desaparición de sustrato (fluorescencia: excitación 310 nm, emisión 400 nm)





Gráficas AII-5. Progresos temporales de la reacción de la mutante 5 a distintas concentraciones de PRA (0-200 micromolar) monitoreadas por la desaparición de sustrato (fluorescencia: excitación 310 nm, emisión 400 nm)

ANEXO III Medios de cultivo y buffers

Medios de Cultivo

LB

10 g. Triptona
 5 g. Extracto de levadura
 5 g. de NaCl
 1 ml NaOH 1N
 Antibióticos
 H₂O c.b.p 1L
 *Para LB sólido, añadir 15g. De Agar.

M9

6 g. Na₂HPO₄
 3 g. KH₂PO₄
 1 g. NH₄Cl
 0.5 g. NaCl
 1 ml MgSO₄ * 7H₂O
 10 ML Glucosa al 20%
 0.1 ml de Tiamina (Vitamina B1) 0.5%
 Agua c.b.p 100 ml

*L-Trptófano cuando es necesario 10mg/ml

*Para M9 sólido, añadir 15 g. de agar noble

Técnicas de Biología Molecular

PCR (reacción)

Buffer de amplificación 10X	5ml
500 mM KCl	
100 mM Tris pH 8.3	
15 mM MgCl	
0.1% gelatina	
Mezcla 4 dNTPs Biolabs (c/u a 2.5 mM)	5µl
Oligonucleotido Fw	10 picomoles
Oligonucleotido Rv	10 picomoles
DNA Templado	5 mg.
Taq polimerasa	2.5 unidades
H2O c.b.p	50 µl

Ligación en vectores

Buffer para DNA Ligasa T4 10X (Fermentas)	2µl
600 MM Tris-HCl	
50 mm MgCl ₂	
50 mm DTT	
10 mm ATP	
pH 7.5	
DNA Ligasa T4 (Fermantas)	1unidad
Vector digerido	20 femtomoles
Inserto digerido	60 femtomoles
H2O c.b.p	20 µl

*Temperatura de incubación 16°C O/N.

Digestión con enzimas de restricción (reacción)

Buffers 10X (NEB Biolabs) (dependiendo de la Enzima)	1µl
DNA (Vector o producto de PCR)	5 µg
Enzima 1	3 u
Enzima 2	3 u
H2O c.b.p	10 µl

*Temperatura de reacción 37°C.

*Uso de BSA (NEB Biolabs) dependiendo de la enzima.

Purificación de Producto de PCR

1. Correr la reacción de PCR finalizada en gel de agarosa a 110 V.
2. Identificar y cortar la banda de acuerdo a su tamaño y pesarla.
3. Adicionar 300 µl de buffer de unión (Roche) por cada gramo de agarosa.
4. Derretir la agarosa en esta solución a 56 °C por 10 min aproximadamente.
5. Agregar 100 µl de Isopropanol por cada gramo de agarosa y agitar vigorosamente.

6. Pasar a una columna la mezcla anterior y centrifugar un minuto a 14000 rpm.
7. Retirar el líquido de la camisa y adicionar 700 µl de buffer de lavado. Centrifugar como en 7.
8. Eliminar el contenido de la camisa por última vez y volver a centrifugar para asegurarse de haber retirado todo el buffer de lavado.
9. Adicionar 100 µl de agua miliQ o buffer de elusión para recuperar el DNA.
10. Mantener el DNA recuperado a 4 °C.

Purificación de plásmido (Roche)

1. Transformar células XL1-Blue con el vector deseado y sembrarlas en cajas de LB con el antibiótico de resistencia.
2. Tomar una colonia y poner un cultivo de 4-5 ml ON a 37°C y 200 rpm.
3. Centrifugar el cultivo anterior a 14000 rpm por 1 min.
4. Retirar el sobrenadante.
5. Resusender la pastilla en 250 µl de bufer de suspensión más RNAsa (solución 1) con agitación vigorosa en vortex.
6. Adicionar 250 µl de buffer de lisis (sol. 2) y agitar lentamente. Dejar reposar 5 min. a temperatura ambiente.
7. Adicionar 350 µl de buffer de unión (sol. 3) e incubar 5 min a 4°C.
8. Centrifugar la mezcla anterior por 1 min a 14000 rpm.
9. Tomar el sobrenadante sin tocar el precipitado blanco y pasarlo a una columna.
10. Centrifugar a 14000 1 min.
11. Eliminar el líquido de la camisa y adicionar 700 µl de buffer de lavado y centrifugar como se indica anteriormente. Desechar el líquido de centrifugado y hacerlo nuevamente para eliminar cualquier rastro de buffer de lavado.
12. Eluir con 100 µl de agua miliQ o buffer de elusión en un tubo limpio.
13. Almacenar la solución que contiene el DNA recuperado a 4°C.

Buffers

- Buffer 1: Buffer de Fosfato de potasio 100mM pH 7.5

KH ₂ PO ₄	4.612 g.
K ₂ HPO ₄	11.4 g.
- Buffer 2: Buffer de Fosfato de potasio 35mM pH 7.5

KH ₂ PO ₄	3.14 g
K ₂ HPO ₄	13.38 g.
- Buffer 3: Tris-HCl 50mM EDTA 1mM
- Buffer 4: Tris-HCl pH 8
 - EDTA 0.5 Mm
 - Glicerol 5%
 - DTT 0.1 MM
 - NaCl 100Mm
- Buffer 5: Tris-HCl pH 8
 - EDTA 0.5 Mm
 - Glicerol 5%
 - DTT 0.1 MM
 - NaCl 25Mm

Reactivos de geles de Acrilamida*Solución de monómeros de acrilamida:*

29,2 g acrilamida

0,8 g bis-acrilamida;

disolver en agua desionizada y aforar a 100 ml.

Filtrar y guardar en botella ámbar de vidrio, en refrigeración (<1 mes).

Amortiguador del gel separador (inferior):

18,15 g Tris; disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 8,8 con HCl, aforar a 100 ml.

Guardar en refrigeración.

Amortiguador del gel compactador (superior):

3,0 g Tris; disolver en ~60 ml de agua, ajustar a pH 6,8 con HCl, aforar a 100 ml.

Guardar en refrigeración.

Amortiguador de la cámara (solución concentrada 10x):

12 g Tris;

57,6 g glicina;

4 g SDS; disolver en ~300 ml de agua. El pH debe quedar entre 8,3-8,4 si las pesadas son correctas (debe evitarse el ajuste del pH para no alterar la fuerza iónica de esta solución). Aforar a 400 ml.

Guardar a temperatura ambiente.

Diluir 10 veces al momento de utilizar.

Persulfato de amonio:

Preparar al momento una solución al 10%. Este reactivo es muy higroscópico (sellar bien el frasco y mantener en desecador). Una alternativa es preparar alícuotas (ej. 200 ml) en viales pequeños y congelarlas.

Solución de SDS:

1,0 g dodecilsulfato de sodio; disolver en 10 ml de agua. Guardar en botella de vidrio a temperatura ambiente.

Amortiguador de muestras no reductor (solución concentrada 2x):

10,0 ml amortiguador del gel superior; 1

6,0 ml solución de SDS;

50 mg azul de bromofenol;

12,0 ml glicerol;

4,0 ml agua; mantener a temperatura ambiente (<2 meses).

Amortiguador de muestras reductor (solución concentrada 2x):

El mercaptoetanol es inestable en esta solución, por lo que se prepara una pequeña cantidad del reactivo para una semana. Agregar 0,2 ml de 2-mercaptoetanol a 4,2 ml del amortiguador no reductor. Guardar a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los agentes son 4% SDS y 5% 2-Me. El 2-Me es tóxico y de olor desagradable (usar en campana de extracción).

Fijador:

500 ml metanol;

0 ml ácido acético glacial;

430 ml agua; Guardar a temperatura ambiente en recipiente hermético. *Importante:* Evitar el

contacto y la inhalación de vapores de metanol.

Colorante Coomassie Blue R-250:

0,25 g Coomassie blue R-250; 225 ml metanol; 46 ml ácido acético; 230 ml agua; disolver el colorante en el metanol, luego agregar el ácido, y finalmente el agua. Mezclar durante 15 min, filtrar y guardar a temperatura ambiente. Aunque el colorante puede ser reusado varias veces para ciertos fines, la sensibilidad declina (usualmente es del orden de 0,5 mg de proteína), por lo que se prefiere usar una pequeña cantidad y descartarla cada vez. Otro tipo de Coomassie, el G-250, puede ser utilizado como colorante para geles, aunque su sensibilidad es menor.

Decolorador:

200 ml metanol; 100 ml etanol; 50 ml ácido acético; 650 ml agua; guardar a temperatura ambiente.

Reactivos Westernblot

Cátodo

Tris base 3 g (25mM)
Glicina 3 g (40mM)
Metanol 200mL (20%)
Llevar a 1L con agua mQ

Ánodo I

Tris base 36.3 g (30mM)
Metanol 200 mL (20%)
Llevar a 1L con agua Mq

Ánodo II

Tris base 3g (25 mM)
Metanol 200 mL (20%)
Llevar a 1L con agua mQ

TBS 20x

Tris-HCl 15.7 g (0.2%)
NaCl 87.66 g (3M)
Llevar a 500 mL con agua mQ
Guardar a 4°C

TBST

TBS 20X 25mL
Tween 20 0.25 mL (0.05%)
Llevar a 500 mL con agua mQ
Guardar a 4°C

Buffers de Purificación de ssTrpD

Buffer de sonicación

Fosfato de Potasio 100 mM
NaCl 300 mM

Solución A

Fosfato de potasio 50 mM
NaCl 300 mM

Solución B

Fosfato de potasio 50 mM
NaCl 300 mM
Imidazol 500 mM

Buffers de Purificación de yAnPRT

Buffer de Lisis yPRT

Fosfatos 100 mM pH 7.5
EDTA 2mM
DTT 1mM
PMSF.....0.3Mm

Buffer para equilibrar columna

Fosfatos 50 mM pH 7.5
NaCl 300mM

Buffer de elusión

Fosfatos 50 mM pH 7.5
NaCl 300mM
Imidazol 500Mm

Buffers de Purificación de ecTrpF, M4 y M5

Buffer de sonicación

Fosfato de potasio pH 7.5 10mM
EDTA Ph 7.7 0.5 mM
NaCl 50mM
Glicerol 5%
DTT 0.1 mM
PMSF 0.5 µL por ml
Lizosima 10mg/mL (1000x)

Solución A

Fosfato de potasio 50 mM
NaCl 300 mM

Solución B

Fosfato de potasio 50 mM
NaCl 300 mM
Imidazol 500 mM
Buffer de diálisis
Fosfato de potasio 50 mM

Buffers de Purificación de ecTrpC

Buffer de soncación
Tris-HCl pH 8 40mM
NaCl 300 mM
Glicerol 10%
Imidazol 10 mM
Lizocima 10mg/mL
Dnasa 1mU/mL
 β -mercaptoetanol 1 mM

Solución A
Fosfato de potasio 50 mM
NaCl 300 mM

Solución B
Fosfato de potasio 50 mM
NaCl 300 mM
Imidazol 500 mM

Buffer de diálisis
Tis-HCl 40 mM
NaCl 200 mM
MgCl 0.5 mM
 β -mercaptoetanol 0.5 mM
EDTA 2 mM

Buffers de Purificación de tmTrpC

Buffer de soncación
Tris-HCl pH 8 40mM
NaCl 300 mM
Glicerol 10%
Imidazol 10 mM
Lizocima 10mg/mL
Dnasa 1mU/mL
 β -mercaptoetanol 1 mM

Solución A
Fosfato de potasio 50 mM
NaCl 300 mM

Solución B
Fosfato de potasio 50 mM
NaCl 300 mM
Imidazol 500 mM

Buffer de diálisis
Tis-HCl 40 mM
NaCl 200 mM
MgCl 0.5 mM
 β -mercaptoetanol 0.5 mM
EDTA 2 mM