



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

**OBTENCIÓN DE UN HOMODÍMERO DEL FRAGMENTO VH DEL
ANTICUERPO CATALÍTICO 1F7, UTILIZANDO A PREFENATO
DESHIDROGENASA COMO REPORTERO DE DIMERIZACIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

PERLA AMALIA RIOS FLORES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOEL OSUNA QUINTERO

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

DR. BALTAZAR BECERRIL LUJÁN

DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELAZCO

CUERNAVACA, MORELOS

Febrero 2014



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

El proceso de realización de esta tesis, fue un camino que involucró muchos cambios y aprendizajes. Fue un trayecto largo y en ocasiones difícil, por lo cual quiero agradecer:

A Dios, por su infinito amor, que me dio guía en los momentos más difíciles.

A mi familia, por su apoyo, sin el cual estos estudios no hubieran sido posibles.

Al Dr. Joel Osuna Quintero, por su guía, su apoyo, su dirección.

A la Dra. Gloria Saab Rincón, por su ayuda y colaboración. Al M.C. Filiberto Sánchez y al Dr. Humberto Flores, por su apoyo.

A los Dres. Baltazar Becerril y Daniel Alejandro Fernández por su apoyo.

Al Instituto de Biotecnología y a la Universidad Nacional Autónoma de México, que hicieron posible este posgrado.

RESUMEN

La ingeniería de proteínas tiene como base fundamental el entendimiento de la función de las mismas. El conocimiento detallado de las bases moleculares de la función permite diseñar y construir proteínas nuevas. Una estrategia ineludible involucra a la evolución dirigida, en la cual, a través de ciclos consecutivos de generación de variantes y la selección racional de éstas, permite identificar variantes de una proteína con características mejoradas.

En la generación de anticuerpos catalíticos se aprovechan las propiedades del sistema inmune que permiten obtener moléculas capaces de reconocer una molécula blanco con alta afinidad. En el laboratorio del Dr. Donald Hilvert se lograron seleccionar anticuerpos con actividad enzimática del tipo corismato mutasa, utilizando como molécula blanco un hapteno análogo al estado de transición (AET) para dicha reacción. Se identificó y caracterizó al anticuerpo 1F7 que presenta un incremento en la velocidad de reacción de 200 kcat/knon.

Estudios cristalográficos demostraron que las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), localizadas en la cadena pesada de 1F7 (H1, H2 y H3), establecen contactos con el análogo al estado de transición, a través de 7 residuos de aminoácido. El dominio variable de la cadena ligera sólo contribuye con una interacción a la estabilización del AET. Es por esto que con la obtención de un homo-dímero del fragmento VH, en comparación con el hetero-dímero VH-VL, se generaría un sitio de unión al AET, con un mayor número de residuos capaces de estabilizarlo y así lograr una mejora de la velocidad de reacción presentada por 1F7.

Fundamentado en esos resultados y en las consideraciones anteriores, en el presente trabajo se planteó el objetivo de mejorar la actividad catalítica de 1F7, mediante la generación de dímeros del dominio variable VH.

Para lograr ese objetivo, se utilizó un sistema de selección de dimerización, el cual se basó en la fusión de 1F7 a la enzima pefenato deshidrogenasa (TyrAEc) de *E. coli* y su sometimiento a 4 ciclos de evolución dirigida. En este proceso se introdujo variabilidad mediante mutagénesis al azar y la subsecuente selección de variantes por complementación de la actividad de pefenato deshidrogenasa en la cepa FA114 de *E. coli*.

Se obtuvieron 12 variantes en 4 ciclos de evolución dirigida; ninguna de las variantes mostró mejoras en la actividad de corismato mutasa del anticuerpo catalítico 1F7.

Una manera de entender por qué no fue posible mejorar la actividad de corismato mutasa es que, por una parte, los eventos de evolución dirigida permitieron identificar variantes capaces de dimerizar (actividad de PDH). Por otra parte, aquellas variantes diméricas y con actividad de corismato mutasa mejorada, tendrían que haber evolucionado en ambas propiedades a la vez.

Si bien las actividades de PDH fueron detectables significando ésto que se logró la dimerización, la actividad de corismato mutasa en ningún caso presentó mejoras

significativas. Esto puede entenderse en términos de una inadecuada formación de los dímeros de VH o la formación de un sitio activo ineficiente para convertir corismato en prefenato.

Así mismo fue encontrado que el fragmento VH_{1F7} no es muy estable por si mismo, por su parte las mutaciones seleccionadas no se encuentran cercanas al sitio activo sino que involucran la introducción de cargas positivas y negativas en la superficie, lo que implicaría que las mutaciones podrían haber sido seleccionadas debido a que aumentaron la solubilidad del fragmento VH, sugiriendo la importancia de iniciar con una proteína estable.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN 1
1.1 Antecedentes 1
CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA 6
2.1 Objetivo General 6
2.2 Hipótesis General 6
CAPÍTULO 3. MARCO TEÓRICO 7
3.1 Ingeniería de proteínas 7
3.1.1 Evolución molecular 7
3.1.2 Estructura tridimensional de proteínas 7
3.2 Evolución dirigida 8
3.2.1 Variación 9
3.2.2 Selección 10
3.2.3 Sistema de selección de corismato mutasa 10
3.3 Inmunoglobulinas 12
3.3.1 Definición y estructura 12
3.3.2 Regiones hipervariables 14
3.3.3 Fuerzas que contribuyen a la especificidad y afinidad antígeno-anticuerpo 15
3.4 Anticuerpos catalíticos 16
3.4.1 Estado de transición de una reacción 17
3.4.2 Bases de los anticuerpos catalíticos 19
3.4.3 El anticuerpo catalítico 1F7 20
 25
3.5 Corismato mutasa 28
3.5.1 Sitio activo de corismato mutasa 30
3.5.2 Comparación con 1F7 30
 30
3.6 Prefenato deshidrogenasa	
 34
3.7 Vector de expresión 34

CAPÍTULO 4. MARCO METODOLÓGICO 35
4.1 Estrategia experimental 35
4.2 Métodos 36
4.2.1 Armado de la proteína de fusión VH _{1F7} -PDH 37
4.2.2 Ciclos de evolución dirigida 40
4.2.3 Ensayos de expresión 42
4.2.4 Ensayos de complementación de actividad de PDH y CM de las variantes seleccionadas 42
4.2.5 Caracterización de variantes seleccionadas 43
CAPÍTULO 5. RESULTADOS 44
5.1 Armado de la proteína de fusión VH _{1F7} -PDH 43
5.2 Primer ciclo de evolución dirigida 46
5.3 Segundo ciclo de evolución dirigida 54
5.4 Tercer ciclo de evolución dirigida 57
5.5 Cuarto ciclo de evolución dirigida 60
5.6 Complementación de actividad de PDH de las variantes seleccionadas 60
5.6.1 Complementación en medio líquido 60
5.7 Complementación de actividad de PDH y CM de las variantes seleccionadas 63
5.7.1 Complementación en medio sólido 64
5.8 Ensayos de expresión de variantes seleccionadas 68
5.9 Expresión de las variantes: 3(2) y 5(10) 69
5.10 Caracterización de variantes obtenidas 69
5.10.1 Clonación con GFP 71
5.10.2 Clonación con colas de histidina -Columnas de níquel 71
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN 75
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 80
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81
ANEXOS 85

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Esquema de aminoácidos que interaccionan con el AET en el heterodímero VL-VH 3
2. Esquema de aminoácidos que interaccionan con el AET el homodímero de VH 3
3. Esquema de los procesos involucrados en la Evolución Dirigida 9
4. Esquema del sistema de selección 11
5. Componentes estructurales de las inmunoglobulinas (IgG)	
6. Estructura de las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) 13 15
7. Diagrama del perfil energético de una reacción 17
8. Esquema de las constantes cinéticas involucradas en una catálisis enzimática 18
9. Rearreglo Claisen de conversión de corismato en prefenato 20
10. Análogo del estado de transición de la conversión de corismato en prefenato 21
11. Residuos presentes en el sitio activo del anticuerpo catalítico 1F7 23
12. Residuos que forman red de puentes de hidrógeno en 1F7 25
13. Esquema del sitio activo de la enzima corismato mutasa de <i>E. coli</i> 27
14. Esquema del sitio activo de la enzima corismato mutasa de <i>B. subtilis</i> 28
15. Esquema del sitio activo de la enzima corismato mutasa de <i>S. cerevisiae</i> 28
16. Comparación de interacciones con el análogo del estado de transición, en los sitios activos de 1F7 y BsCM 29
17. Diagrama de cintas de la estructura dimérica de TyrA de <i>Haemophilus influenzae</i> 31
18. Diagrama de cintas de la estructura monomérica de TyrA de <i>Haemophilus influenzae</i> 31
19. Actividades y niveles de expresión de TyrA _{Ec} , en fusiones en extremo N y C terminal 32
20. Actividades y niveles de expresión de TyrA _{Ec} , en fusiones con diferentes variantes de Gβ1 33 34
21. Regiones de control empleadas en vectores de expresión	
22. Construcción del plásmido pTrc99A que porta VH _{1F7} -TyrA _{Ec} 43
23. Esquema de proceso de selección 44
24. Actividades relativas de PDH. Variantes analizadas en el primer ciclo de evolución dirigida 45
25. Actividades relativas de PDH. Variantes analizadas en el segundo ciclo de evolución dirigida. Banco 2 46

26. Actividades relativas de PDH. Variantes analizadas en el segundo ciclo de evolución dirigida. Banco 10 47
27. Cinética de crecimiento en medio de complementación. Banco I 48
28. Cinética de crecimiento en medio de complementación. Banco 2 49
29. Cinética de crecimiento en medio de complementación. Banco 10 50
30. Actividades relativas de las variantes A4, D2 y C11, del segundo ciclo de evolución dirigida 51
31. Localización de las mutaciones presentes en las variantes A4, D2 y C11 52
32. Cinéticas de crecimiento en medio de complementación, de variantes evaluadas en el tercer ciclo de evolución dirigida 55
33. Secuencia de las variantes seleccionadas en el tercer ciclo de evolución dirigida 56
34. Cinética de crecimiento en medio de complementación, de variantes evaluadas en el cuarto ciclo de evolución dirigida 58
35. Localización de las mutaciones seleccionadas en tres ciclos de evolución dirigida 59
36. Crecimiento en medio de complementación de variantes obtenidas en 3 ciclos de evolución dirigida, sin IPTG 60
37. Crecimiento en medio de complementación de variantes obtenidas en 3 ciclos de evolución dirigida, a 100 μ M de IPTG 61
38. Crecimiento en medio de complementación de variantes obtenidas en 3 ciclos de evolución dirigida, a 500 μ M de IPTG 61
39. Crecimiento en medio de complementación de variantes obtenidas en 3 ciclos de evolución dirigida, a 100 μ M de IPTG y tirosina, como control positivo 62
40. Gel de poliacrilamida 12.5%, variantes 2 - C11 64
41. Gel de poliacrilamida 12.5%, variantes A11 - H5 65
42. Gel de poliacrilamida 12.5%, variantes VH - 3(2), fracciones soluble e insoluble 66
43. Gel de poliacrilamida 12.5%, variantes 3(10) - C11, fracciones soluble e insoluble 67
44. Gel de poliacrilamida 12.5%, variantes A11 - H5, fracciones soluble e insoluble 67
45. Gel de poliacrilamida 12.5%, variantes VH, 3(2), 5(10), fracciones soluble e insoluble 68
46. Esquema de la construcción VH _{1F7} -GFP realizada en el vector pTrc99A 69
47. Gráfico de intensidad de fluorescencia de fusiones con GFP 70
48. Gel de poliacrilamida 20%, fracciones de purificación de VH _{1F7} , 30°C 72
49. Gel de poliacrilamida 20%, fracciones de purificación de VH _{1F7} , 20°C 73
50. Efecto del β -mercaptoetanol en la migración del fragmento VH _{1F7} a ser purificado 74

Cuadros

1. Parámetros cinéticos del anticuerpo catalítico 1F7	21
2. Parámetros catalíticos de enzimas corismato mutasa de diferentes organismos	26
3. Parámetros termodinámicos de distintas corismato mutasas	26
4. Cantidades de reacción respecto al nivel de mutagénesis	38
5. Mutaciones primer ciclo de evolución dirigida	45
6. Mutaciones segundo ciclo de evolución dirigida	47
7. Mutaciones segundo ciclo de evolución dirigida, 96 variantes	51
8. Mutaciones tercer ciclo de evolución dirigida	57
9. Mutaciones seleccionadas en tres ciclos de evolución dirigida	59
10. Fluorescencia de variantes fusionadas con GFP	70
• Anexos		
1. Complementación de actividad de PDH Banco I	86
2. Complementación de actividad de PDH Banco 2	87
3. Complementación de actividad de PDH Banco 10	88
4. Triplicado de curvas de crecimiento en medio de complementación, para las variantes obtenidas en cuatro ciclos de evolución dirigida	89
5. Cinética de crecimiento en medio de complementación para actividad de corismato mutasa, 45hrs	90
6. Triplicados de cinética de crecimiento en medio de complementación para actividad de corismato mutasa, 19hrs	91
7. Complementación de actividad de corismato mutasa, en medio de complementación sólido		
8. Complementación en medio sólido, dilución 1/1000, 2 días, Y	93
9. Complementación en medio sólido, sin dilución, 2 días, Y	93
10. Complementación en medio sólido, dilución 1/1000, 5 días, Y	93
11. Complementación en medio sólido, sin dilución, 5 días, Y	93
12. Complementación en medio sólido, dilución 1/1000, 5 días	94
13. Complementación en medio sólido, sin dilución, 5 días	94
14. Cuadro 1. Cinética de crecimiento a expresión, 12hrs	95
15. Gráfico de cinética de crecimiento a expresión, 12hrs	95
16. Triplicado de actividades de pefenato deshidrogenasa, variantes VH, 3(2) y 5(10). Ensayo 1	96
17. Cuadro 2. Valores para actividades de pefenato deshidrogenasa y desviaciones estándar, variantes VH, 3(2) y 5(10). Ensayo 1	96
18. Actividades relativas de pefenato deshidrogenasa, variantes VH, 3(2) y 5(10). Ensayo 1	97

19. Triplicado de actividades de pefenato deshidrogenasa, variantes VH, 3(2) y 5(10). Ensayo 2 97
20. Cuadro 3. Valores para actividades de pefenato deshidrogenasa y desviaciones estándar, variantes VH, 3(2) y 5(10). Ensayo 2 98
21. Actividades relativas de pefenato deshidrogenasa, variantes VH, 3(2) y 5(10). Ensayo 2 99
22. Actividades de corismato mutasa, variantes VH, 3(2), 5(10). Ensayo 1 99
23. Actividades de corismato mutasa, variantes VH, 3(2), 5(10). Ensayo 2 100
24. Actividades de corismato mutasa, variantes VH, 3(2), 5(10). Ensayo 3 100
25. Actividades de corismato mutasa, variantes VH, 3(2), 5(10). Control sin extracto 101

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este proyecto de investigación se basa en la aplicación de técnicas de evolución dirigida para mejorar la actividad catalítica del anticuerpo 1F7.

La importancia de los anticuerpos catalíticos radica en la relativa facilidad con la que pueden modificarse para reconocer diferentes compuestos con una alta afinidad y especificidad. La selección es realizada contra una molécula análoga del estado de transición (que actúa como hapteno) de la reacción a catalizar, creando así moléculas de anticuerpos capaces de catalizar reacciones específicas, teniendo aplicaciones en campos como la industria y la investigación médica, debido a la capacidad de generar un catalizador en reacciones que carecen de una enzima natural.

Este proyecto se basa en la aplicación de técnicas de evolución dirigida (basadas en la generación de variabilidad y selección), empleando específicamente, para introducir variabilidad en el gene del anticuerpo 1F7, técnicas de PCR mutagénica y shuffling, y realizando selección respecto a actividad de prefenato deshidrogenasa y corismato mutasa.

1.1 Antecedentes

La ingeniería de proteínas es una rama de la bioquímica, que aplica conocimientos de matemáticas, fisicoquímica y biología molecular, para el entendimiento de la función de las proteínas, así como el diseño y la construcción de proteínas nuevas [1].

Los avances en esta área incluyen desde mutaciones puntuales [2], generación de bibliotecas basadas en la combinación de elementos de estructura secundaria, como en el caso del laboratorio del Dr. P.G. Schultz [3], hasta el diseño racional, utilizando técnicas computacionales, como ha sido desarrollado por el grupo del Dr. David Baker [4].

Como ha sido mencionado por Linda G. Otten y Wim J. Quax [5], la evolución dirigida es una estrategia evolutiva implementada en el laboratorio, usada también como método para la ingeniería de proteínas. Debido a su rápido desarrollo, se ha convertido en el método de elección de los ingenieros de proteínas, a manera de crear enzimas con las propiedades deseadas para todo tipo de procesos.

La ingeniería de proteínas y la evolución dirigida, están enfocadas a la generación de variantes con propiedades mejoradas, entre ellas, la posibilidad de obtener nuevas actividades enzimáticas. Como es sabido, las enzimas son catalizadores naturales cuya alta selectividad y velocidad de reacción han fascinado a químicos y biólogos de tal forma, que se han explorado **diversas estrategias para la generación de nuevos biocatalizadores**. Uno de los avances más interesantes lo constituye la generación de **anticuerpos catalíticos**, los cuales representan una opción prometedora en cuanto a la generación *de novo* de actividades catalíticas que no cuenten con un catalizador natural para llevarse a cabo [6].

Los anticuerpos son conocidos por su capacidad de unir antígenos con alta especificidad dentro del marco de la respuesta inmune [7]. Específicamente, los dominios variables de los anticuerpos forman el sitio de reconocimiento al antígeno, mientras que los dominios constantes (de las cadenas pesadas y ligeras) funcionan como determinantes para ser reconocidas por moléculas de los sistemas inmunes efectores [7].

La naturaleza química del sitio de unión a antígenos en los anticuerpos, constituye un aspecto muy importante respecto a la unión hapteno-anticuerpo. Termodinámicamente, el proceso de unión de una molécula a un anticuerpo, se encuentra asociado con una pérdida entrópica significativa debido a la pérdida de grados de libertad conformacionales, rotacionales, vibracionales y traslacionales de los residuos de aminoácidos involucrados en la unión, la cual que es compensada por una ganancia entálpica. La interacción del hapteno con superficies polares del anticuerpo, da lugar a un mayor número de contactos específicos hapteno-anticuerpo, sin embargo también existe un número importante de contactos poco específicos que se producen debido a la interacción con superficies no polares.

Las interacciones dipolo-dipolo así como interacciones que involucren puentes de hidrógeno y puentes salinos son las que contribuyen a la especificidad en los contactos hapteno-anticuerpo [8]. Sin embargo, solo un número muy limitado de contactos tienen relevancia energética en la unión.

La generación de anticuerpos catalíticos explota la habilidad del sistema inmune para producir anticuerpos con una alta afinidad, en este caso, afinidad por análogos del estado de transición de la reacción que se desea catalizar.

Debido a que el reconocimiento inmune se basa en la forma y en la complementariedad química antígeno-anticuerpo, la inmunización con una molécula templado adecuada, (como un análogo del estado de transición de una reacción), puede generar anticuerpos con propiedades de auténticas enzimas, como lo son, la capacidad para acelerar velocidades de reacción, especificidad de sustrato, así como regio-estereoselectividad [6].

En 1988, el laboratorio del Dr. Donald Hilvert realizó una selección de anticuerpos monoclonales con actividad de corismato mutasa, utilizando como hapteno, un compuesto análogo al estado de transición de esta reacción. Se seleccionó al anticuerpo llamado 1F7, ya que poseía la mejor actividad catalítica ($k_{cat}/k_{non} = 200$) [9]. Estudios cristalográficos demostraron, que en 1F7, el hapteno interactúa principalmente con el extremo variable de la cadena pesada (V_H), haciendo contactos en CDR H1 (con dos residuos), en H2 (con un residuo) y en H3 (con cuatro residuos). Esta utilización preferencial de la cadena pesada en CDRs, es consistente con muchos otros complejos de estructuras Fab (fragmento de unión a anticuerpo), sin embargo 1F7 representa un caso extremo [10].

En base a las características anteriores y considerando que una mayor estabilización del estado de transición por parte de la enzima, es el principal

responsable de la aceleración en la velocidad de reacción [11], se hipotetizó que la formación de dímeros del fragmento VH_{1F7}, proveería al sitio catalítico de 1F7 de un mayor número de contactos con el hapteno, lo cual podría llevar a una mejora en la actividad catalítica del anticuerpo.

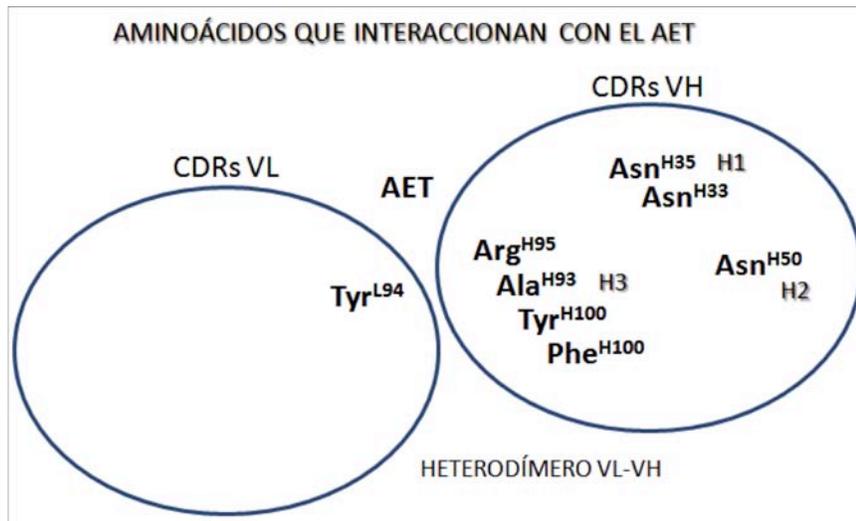


Figura 1. Representaciones de los fragmentos VH y VL mostrando los aminoácidos que interaccionan con el AET. 7 aminoácidos interaccionan con el AET en el caso de VH, mientras que VL solo interacciona mediante 1 residuo.

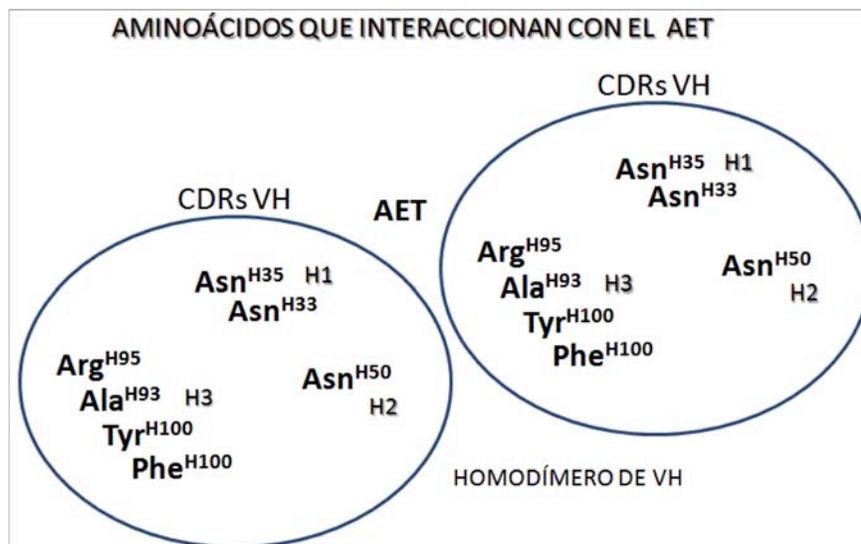


Figura 2. Aminoácidos de las CDRs de VH que interaccionan con el AET.

Las dos figuras anteriores ilustran el número de contactos con el AET existentes en el caso del heterodímero VL-VH y en el caso del homodímero de VH. Como se puede observar, el homodímero de VH estabilizaría en mayor medida el AET. Por lo tanto, en este proyecto se pretenden obtener homodímeros de VH, para reemplazar así al fragmento VL, el cual no estabiliza al AET (VL sólo interacciona con el AET mediante un aminoácido como se muestra en las figuras 1 y 2, y como se indica en el Marco Teórico págs. 21-24), reemplazando así al fragmento VL por otra copia del fragmento VH, el cual si estabiliza al AET, mediante 7 interacciones, como se muestra en las figuras 1 y 2, y como se indica en el Marco Teórico págs. 21-24.

De manera que un mayor número de contactos con el hapteno o análogo al estado de transición (TSA), de la reacción catalizada por el anticuerpo catalítico 1F7, estabilizaría en mayor medida el estado de transición de la reacción, dando como resultado un aumento en la velocidad de reacción en 1F7.

Respecto a la formación de dímeros de VH, puede hacerse alusión a lo mencionado por Jorge Sepúlveda en el año 2003 [12], quien demuestra que a nivel computacional es posible obtener dímeros del fragmento variable de la cadena pesada de un anticuerpo. Por otro lado, Serge Muyldermans, también menciona la formación de dímeros estables a partir de regiones variables de cadena pesada, de anticuerpos provenientes de camellos, denominados VHH o dominios variables de cadena pesada, de un anticuerpo de cadena pesada [13].

Respecto a las estrategias alternativas para mejorar la actividad del anticuerpo 1F7, una de ellas la podría constituir el diseño racional de mutaciones en el sitio de unión al hapteno del anticuerpo 1F7. Estas mutaciones tendrían que estar orientadas a imitar las interacciones con el TSA existentes en el caso de diversas enzimas corismato mutasas, como se ilustra en las figuras 17, 18 y 19 de la sección de Marco Teórico. Así mismo en la figura 20, se ilustra una comparación de los contactos existentes con el TSA, entre 1F7 y la enzima corismato mutasa de *B. subtilis*. En esta comparación es posible observar un mayor número de interacciones electrostáticas que estabilizan el TSA en el sitio activo de BsCM, las cuales derivan en una mayor velocidad de reacción. De manera que una propuesta alternativa para mejorar la actividad catalítica del anticuerpo 1F7, la constituye el realizar un diseño racional en el sitio de unión al hapteno, de forma que pudieran incrementarse el número de contactos con el TSA. Sin embargo, la metodología de evolución dirigida, permite en cada ciclo de evolución, el probar in vivo las variantes seleccionadas, constituyendo una gran ventaja en comparación con las predicciones teóricas que se pudiesen realizar mediante diseño racional.

Otra estrategia para mejorar la actividad del anticuerpo catalítico 1F7, la constituye el diseñar de manera más eficiente el análogo al estado de transición de la reacción (TSA), a emplear como hapteno. La figura 14 del Marco Teórico, ilustra la molécula análogo al estado de transición de la reacción catalizada por 1F7, la cual fue sintetizada químicamente y empleada como hapteno para inducir la respuesta inmune a partir de la cual fue seleccionado el anticuerpo catalítico 1F7 [9]. Sin embargo, es mencionado que esta molécula utilizada como hapteno, induce la formación de un anticuerpo con un sitio de unión a hapteno carente contactos

electrostáticos con el TSA (en comparación con el sitio activo de corismato mutasa), mencionando que esta molécula induce la presencia, entre otros, de un residuo de AsnH33, el cual si bien es capaz de formar un puente de hidrógeno con el grupo localizado en la posición C-4 del hapteno, es por su parte incapaz de estabilizar cargas positivas en el estado de transición de la reacción (**Ver Marco Teórico pág. 23**). Se propone que, si el TSA contuviera, en vez de un grupo hidroxilo, un grupo amino, en la posición C-4 (ver figura 10), este induciría la formación de un residuo de AspH33 (en vez del residuo de AsnH33 existente en el actual TSA), el cual sería capaz de estabilizar una carga positiva más en el estado de transición de la reacción, constituyendo una interacción electrostática más, y pudiendo derivar en una mejor velocidad de reacción por parte de 1F7 [10]. Sin embargo, esto constituiría todo un nuevo proceso para la obtención de inmunoglobulinas a partir de un nuevo hapteno, lo cual conlleva a su vez dificultades en la obtención y aislamiento (purificación) de inmunoglobulinas, además de existir complicaciones en el proceso de síntesis de un nuevo TSA.

De esta forma, en este proyecto es utilizado un reportero de dimerización para seleccionar dímeros del fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7, los cuales podrían derivar en una mejor actividad catalítica de 1F7.

Estudios realizados en el laboratorio del Dr. Joel Osuna Quintero, demuestran la viabilidad de la utilización de la enzima prefenato deshidrogenasa ($TyrA_{Ec}$) como reportero de dimerización [14]. Esta enzima forma parte de la proteína bifuncional T de *E. coli*, un homodímero de 373 aminoácidos, que presenta actividades tanto de prefenato deshidrogenasa ($TyrA_{Ec}$) como de corismato mutasa ($AroQ_T$), las cuales forman parte de la ruta biosintética de la tirosina. Se ha demostrado la existencia de interacciones cooperativas entre los dominios de $AroQ_T$ y $TyrA_{Ec}$ [15], observando la pérdida de actividad de prefenato deshidrogenasa al ser clonada de manera independiente. Por lo tanto, en este proyecto se utilizó únicamente el fragmento $TyrA_{Ec}$ de la proteína T, fusionado a variantes del fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7, en eventos de evolución dirigida, con objetivo de seleccionar variantes homodiméricas de VH.

CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Los estudios cristalográficos del anticuerpo catalítico 1F7 con su hapteno indican un mayor número de contactos del fragmento VH con el hapteno [10], por lo que se propone la obtención de variantes homodiméricas de VH_{1F7} como estrategia para mejorar la actividad catalítica del anticuerpo 1F7. De esta manera se incrementarían el número de contactos estabilizadores del estado de transición de la reacción, lo cual se vería reflejado en una mayor actividad enzimática.

Para este fin se plantea la fusión del gene que codifica para el fragmento VH del anticuerpo 1F7, al gene de la enzima preferato deshidrogenasa (TyrA_{Ec}). Esta enzima TyrA_{Ec} requiere de la dimerización para ser funcional. La hipótesis de trabajo es que sólo en aquellos casos en los que se formen dímeros de VH_{1F7}, se formarán dímeros de TyrA_{Ec}, los cuales tienen actividad de preferato deshidrogenasa, permitiendo su utilización como reportero de dimerización. Se utilizará además una selección mediante actividad de corismato mutasa, para evaluar bibliotecas de mutantes generadas con la técnica de PCR mutagénica al azar.

2.1 Objetivo General

Obtener variantes homodiméricas del fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7, con mejor actividad catalítica que el anticuerpo original [9].

2.2 Hipótesis General

Mediante la utilización de un sistema de selección basado en actividad de preferato deshidrogenasa (TyrA_{Ec}), y de corismato mutasa (fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7), en contexto con ciclos de evolución dirigida, utilizando como medio de introducción de variabilidad a la metodología de PCR mutagénica al azar, podrán seleccionarse variantes homodiméricas de VH_{1F7} con mejor actividad catalítica.

CAPÍTULO 3. MARCO TEÓRICO

3.1 INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

La ingeniería de proteínas es una rama de la bioquímica que aplica conocimientos de biofísica, bioquímica y biología molecular, principalmente al entendimiento de la función de las proteínas, así como al diseño y la construcción de proteínas nuevas [1]. A continuación se describen dos conceptos básicos en los que la ingeniería de proteínas está sustentada: la **Evolución molecular** y la **Estructura tridimensional de proteínas**.

3.1.1 Evolución molecular

A partir de lo propuesto en 1965 por Emile Zuckerkandl y Linus Pauling [16], se acepta que las proteínas con diferentes propiedades bioquímicas podrían evolucionar a partir de una proteína ancestral sencilla a través de variaciones genéticas del gen original.

Muchas enzimas han evolucionado mediante **duplicación genética**, fusión, o mediante el ensamblado en oligómeros funcionales [17]. A través de duplicaciones genéticas, es que han surgido genes nuevos al acumular mutaciones que generan actividades distintas; se piensa que este fenómeno ha sido clave para generar la diversidad natural existente [18]. Por otra parte, la **recombinación genética** produce nuevas variantes que poseen propiedades provenientes de ambos donadores, o incluso propiedades totalmente nuevas. La variabilidad genética es entonces el motor de la evolución.

La selección natural también puede generar proteínas con la misma actividad, pero con diversas propiedades catalíticas, lo que permite que un organismo se adapte a distintas condiciones.

3.1.2 Estructura tridimensional de proteínas

En los últimos 40 años, se comenzó a caracterizar la estructura tridimensional de las proteínas, es decir, la descripción de la posición en el espacio de cada uno de los átomos que la componen. Esta labor, es el fruto del desarrollo y adaptación de técnicas, como la cristalografía de rayos X. Así, el acceso a estas estructuras tridimensionales de proteínas, nos permite realizar estudios comparativos y derivar nociones generales acerca de la arquitectura de estas moléculas, así como su funcionamiento a nivel atómico [19]. Esto nos permite entender la participación de cada uno de los aminoácidos en la catálisis de una enzima [20].

La evolución molecular y la estructura tridimensional de las moléculas, son conocimientos necesarios al realizar un trabajo de ingeniería de proteínas, ya que, por una parte se tiene información acerca de la variabilidad de cada residuo, y por otro lado, su posición tridimensional y las interacciones que forma [21].

Así, el ingeniero de proteínas diseña mutaciones en los sitios donde cree que éstas pueden tener un efecto específico sobre una función (la actividad catalítica), y utiliza la información evolutiva, para seleccionar el tipo de cambio deseado, todo esto siempre basado en la relación: secuencia, estructura y función.

La ingeniería de proteínas depende del conocimiento *a priori* de una gran cantidad de información, tanto estructural como evolutiva, la cual no siempre está disponible, además de que a veces no es posible llevar a cabo predicciones precisas acerca de los efectos que ciertas mutaciones específicas podrían tener en las proteínas. De manera que, la ingeniería de proteínas con frecuencia solo toma a una proteína de secuencia y estructura conocidas, y tiende al mejoramiento de alguna de sus propiedades, como pueden ser: el aumento de su estabilidad o el cambio en su especificidad [22]. En el diseño *de novo*, al elegir pares o incluso clusters de residuos, el criterio incluiría: la complementariedad en forma local, tamaño y polaridad, así como la optimización en el empaquetamiento, la formación de puentes de hidrógeno y las interacciones carga-carga [22].

3.2 EVOLUCIÓN DIRIGIDA

Linda G. Otten y Wim J. Quax [5], definen a la evolución dirigida como una estrategia evolutiva en el laboratorio, usada como método para la ingeniería de proteínas. Esta técnica se ha desarrollado de manera muy rápida, y se ha convertido en una herramienta poderosa a la cual recurren muchos ingenieros de proteínas, creando enzimas con las propiedades deseadas.

Como es sabido, la evolución es un proceso lento y continuo, por medio del cual, las especies vivientes son capaces de diversificarse y adaptarse a los cambios del medio. Es a través de diversos ciclos de mutación, selección y amplificación, que nuevas características son acumuladas en una población de organismos, de forma que aquellas que originen una ventaja, serán conservadas en las generaciones siguientes [23].

Así, la evolución dirigida permite llevar a cabo la selección de variantes de proteínas con características mejoradas mediante la utilización de ciclos consecutivos de variación y selección. La identificación de variantes interesantes en bibliotecas combinatorias grandes, puede llevarse a cabo generalmente a través del análisis de todos los miembros de la biblioteca de manera individual (screening), o bien, mediante la aplicación de condiciones específicas, que permitan “identificar” sólo aquellas variantes de interés (selección).

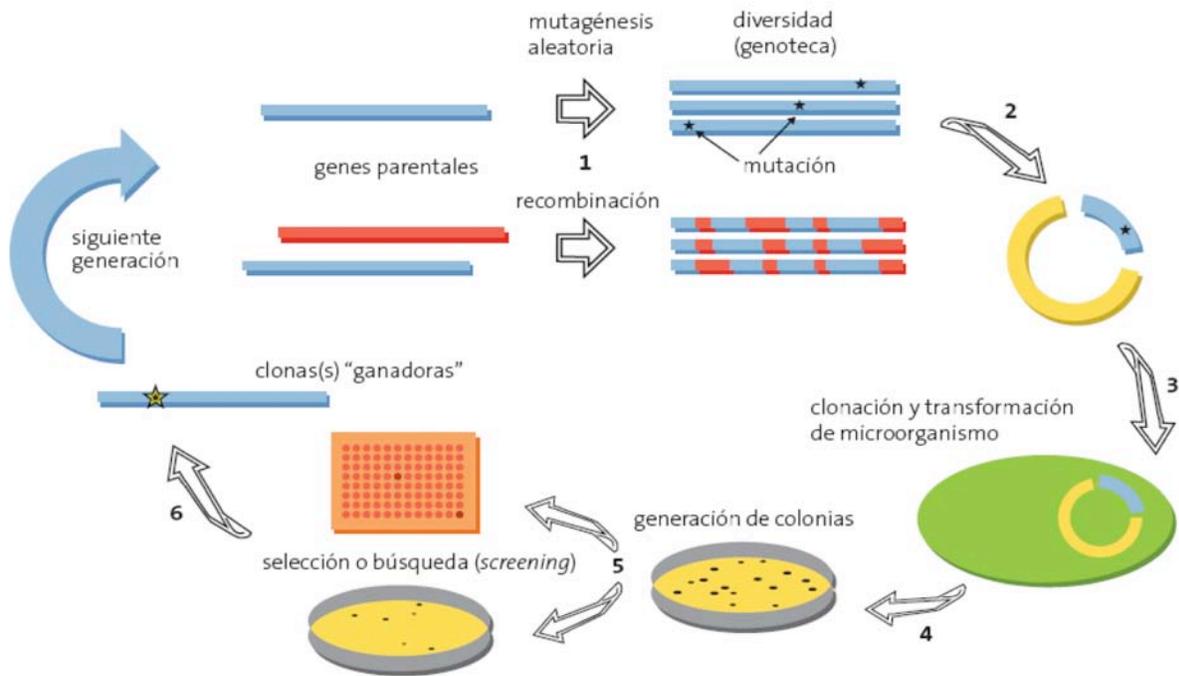


Figura 3. Esquema de los procesos involucrados en la Evolución Dirigida. [45]

Como ilustra la figura 3, el proceso de Evolución Dirigida está integrado por ciclos reiterativos de variación y selección, lo que a su vez involucra la clonación y generación de bancos de variantes. A continuación se habla un poco más acerca de los procesos de variación (mutagénesis) y selección.

3.2.1 Variación

En la naturaleza, la evolución se lleva a cabo mediante mutaciones al azar, la recombinación y la sobrevivencia de aquellas variantes con cualidades mejores [5].

En el laboratorio, las mutaciones pueden llevarse a cabo: en sitios específicos (mutagénesis *sitio-dirigida*), al azar en todo el gen o a través de la técnica conocida como *DNA shuffling* [24], la cual fue desarrollada por el científico Willem P.C. Stemmer, que utiliza la recombinación con el objetivo de imitar el proceso de evolución.

Usando como base el *shuffling*, se han podido desarrollar nuevas variantes de recombinación. Éstas pueden ser divididas en seis categorías: *shuffling*, *shuffling* parental de longitud completa (*Full lenght parent shuffling*), entrecruzamiento sencillo (*Single cross-over*), intercambio de dominios (*Domain swapping*), recombinación *in vivo* (*In vivo recombination*) y *shuffling* sintético (*Synthetic shuffling*) [5].

A partir de los bancos de variantes generados, las variantes deseadas deben ser identificadas mediante procedimientos de selección o de tamizaje (*screening*).

3.2.2 Selección

El éxito de los experimentos de evolución dirigida, depende en gran parte del método de selección o tamizaje a utilizar. Es necesario que estos métodos sean lo suficientemente sensibles y específicos, para identificar las mutaciones positivas.

En el método de tamizaje o "búsqueda", se analizan de manera individual todos los miembros de la biblioteca, o tantos como sea posible. En el método de selección, se aplican condiciones que permitan identificar sólo las variantes de interés; para ello, se cuenta con organismos cuya sobrevivencia dependa de la propiedad que se busca [23].

La selección mimetiza la sobrevivencia natural del *mejor adaptado*, y es el mejor método para la identificación de una mutante deseada. Sólo mutaciones de interés pueden ser *vistas* o aparecer, debido a que las mutantes con la función enzimática deseada, proveerán a la célula hospedero de una ventaja en comparación con la célula que contiene el gen silvestre. Así, la selección genética permite analizar poblaciones grandes y es sólo limitada por la eficiencia de transformación del DNA en las células, lo cual puede permitir el análisis de varios millones de variantes.

En ambas técnicas (tamizaje y selección), el gene que se va a mutar, se clona en vectores que contienen un origen de replicación para la célula huésped, así como algún marcador de selección (generalmente la resistencia a algún antibiótico).

El proceso de clonación, involucra la ligación enzimática de los extremos de un fragmento de DNA (que contiene el gene de interés), en el vector apropiado. El producto de la ligación, posteriormente es introducido a un hospedero para su expresión, siendo la bacteria *E. coli* el hospedero más comúnmente utilizado. Durante este proceso de transformación, sólo un pequeño porcentaje de las células toman el DNA (producto de la ligación). Para seleccionar las células transformadas, las células son plateadas en un medio de crecimiento con un antibiótico específico, cuya resistencia se encuentra en el plásmido utilizado, creciendo sólo aquellas células que portan el vector deseado [23].

3.2.3 Sistema de selección de corismato mutasa

En este proyecto, se utiliza un método de selección basado en la actividad que presentan las enzimas pefenato deshidrogenasa y corismato mutasa. La enzima corismato mutasa cataliza la conversión de corismato en pefenato, mientras que la enzima pefenato deshidrogenasa cataliza la conversión de pefenato en p-hidroxifenilpiruvato. Ambas conversiones forman parte de la vía metabólica del ácido shikímico, del cual se producen los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina [15].

Para que este sistema de selección pueda funcionar, la cepa de *E. coli* a utilizar, no debe contener el gen *tyrA*, el cual codifica para la proteína T, una proteína bifuncional que presenta las actividades de corismato mutasa y prefenato deshidrogenasa. De esta manera, la bacteria no puede crecer en ausencia de tirosina. Para efecto de seleccionar sólo por actividad de prefenato deshidrogenasa, la actividad de corismato mutasa puede ser restituida al incorporar un plásmido adicional que contenga un gen codificante para esta actividad [50].

En este proyecto, la cepa de selección utilizada es la cepa FA114 de *E. coli*, la cual contiene delecciones en los genes codificantes para las proteínas T y P (claves en la producción de tirosina y fenilalanina, respectivamente). Para seleccionar sólo mediante actividad de prefenato deshidrogenasa (la cual forma parte de la proteína T), además de adicionar fenilalanina en el medio, el plásmido adicional pACYC es incorporado, el cual contiene el gen codificante para la enzima corismato mutasa (AroQ_P), proveniente del gen *pheA*, (que codifica para la proteína P de *E. coli*, la cual es parte de la ruta biosintética de fenilalanina).

Así, en este sistema, solo las células capaces de catalizar la conversión de prefenato en 4-OH-fenilpiruvato, producirán tirosina, y por lo tanto serán capaces de crecer en medio carente este aminoácido (figura 4).

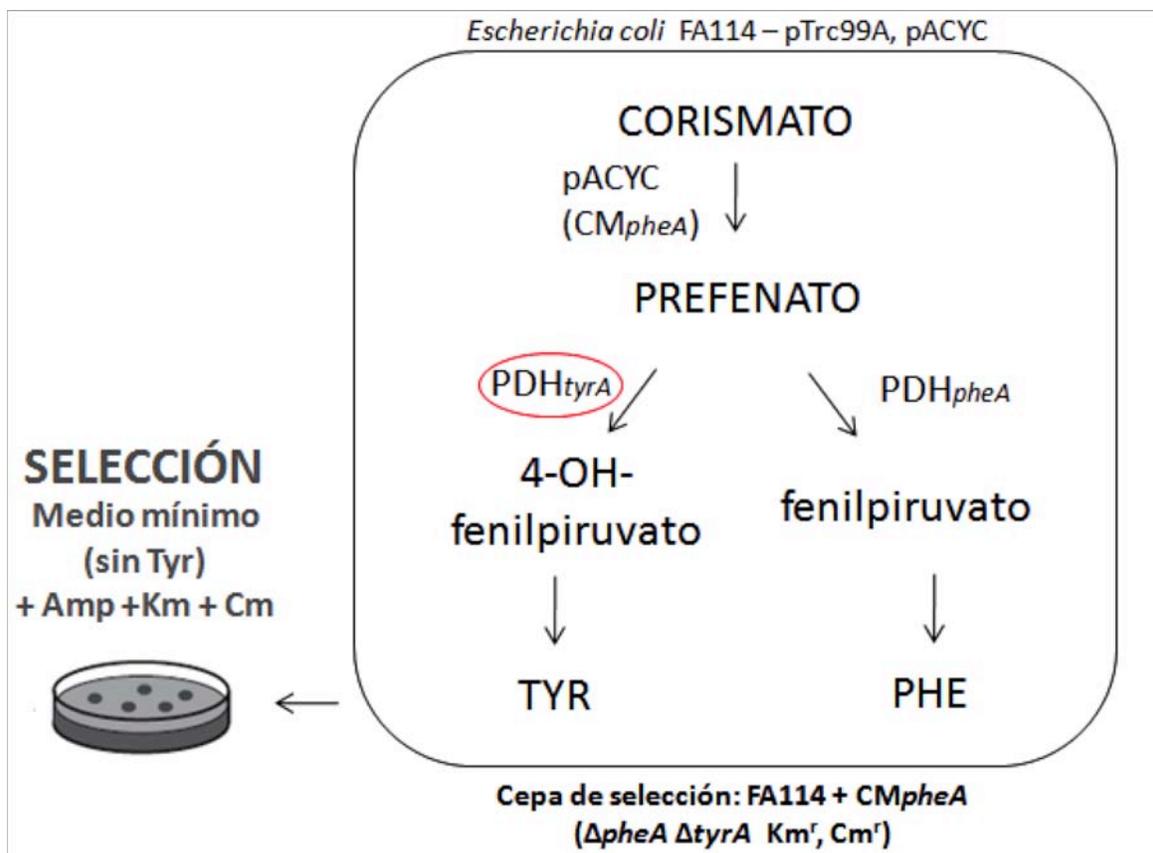


Figura 4. Esquema del sistema de selección basado en actividad de prefenato deshidrogenasa en *E. coli*. Las células portadoras de variantes capaces de permitir la actividad de PDH, podrán crecer en medio carente de tirosina. Basado en figura de (23).

De manera que la cepa FA114 de *E. coli* carece del gen *tyrA*, codificante para la proteína T, la cual presenta actividades de pterinato deshidrogenasa ($TyrA_{EC}$ o PDH_{tyrA}) y corismato mutasa ($AroQ_T$) [26,23]. El gene codificante para el fragmento $TyrA_{EC}$ de la proteína T, es incluido en el vector de expresión pTrc99A. En este proyecto se realizaron fusiones de este gene con variantes del fragmento VH_{1F7} .

Así, este medio de selección, basado en medio de complementación sin tirosina, permite seleccionar clonas funcionales, las cuales son:

1. Aquellas capaces de catalizar la conversión de pterinato en 4-OH-fenilpiruvato. Seleccionando así, solamente mediante actividad de pterinato deshidrogenasa ($TyrA_{EC}$), (el reportero de dimerización), a variantes homodiméricas de VH_{1F7} .
2. Aquellas capaces de catalizar la conversión de pterinato en 4-OH fenilpiruvato ($TyrA_{EC}$), además de la conversión de corismato en pterinato. Seleccionando de esta manera, dímeros de VH, capaces además de catalizar la conversión de corismato en pterinato, o actividad de corismato mutasa, esto debido a que, al no contar con actividad de $AroQ_T$, la actividad de corismato mutasa existente se debiera únicamente a la actividad catalítica del homodímero de VH.

Además en este sistema de selección, el fenotipo deseado se encuentra ligado al genotipo correspondiente, de forma automática, permitiendo un método de aislamiento sencillo [23].

3.3 INMUNOGLOBULINAS

3.3.1 Definición y estructura

Los anticuerpos son moléculas conocidas por su capacidad de unir antígenos dentro del marco de la respuesta inmune [7]. Estas proteínas son capaces de identificar y unir fuertemente sustancias extrañas, que pudieran dañar al organismo, como parte del mecanismo de defensa inmune [27].

Los anticuerpos IgG están constituidos por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas cortas idénticas y dos cadenas largas, las cuales contienen secuencias homólogas repetidas de aproximadamente 110 aminoácidos. La estructura monomérica consiste en dos cadenas polipeptídicas, una de mayor longitud (450-475 aminoácidos), la cual es denominada cadena pesada, y la otra de una longitud menor (220 residuos de aminoácido), que es denominada cadena ligera [28]. La cadena ligera (L), se encuentra asociada al extremo N terminal de la cadena pesada (H) a través de puentes disulfuro [28].

Las cadenas se pliegan de manera individual en dominios estructurales similares, constituidos por una bicapa de láminas beta antiparalelas, resultando en una

estructura en forma de barril beta, la cual contiene una región central de unión a antígeno.

La figura 5 ilustra los dominios estructurales que constituyen las inmunoglobulinas IgG. Son 12 dominios estructurales similares, 8 de los cuales pertenecen a las dos cadenas pesadas, y 4 a las cadenas ligeras [8]. El extremo N-terminal de todas las moléculas de inmunoglobulina, presenta una gran variabilidad respecto al tipo y el número de aminoácidos que lo forman.

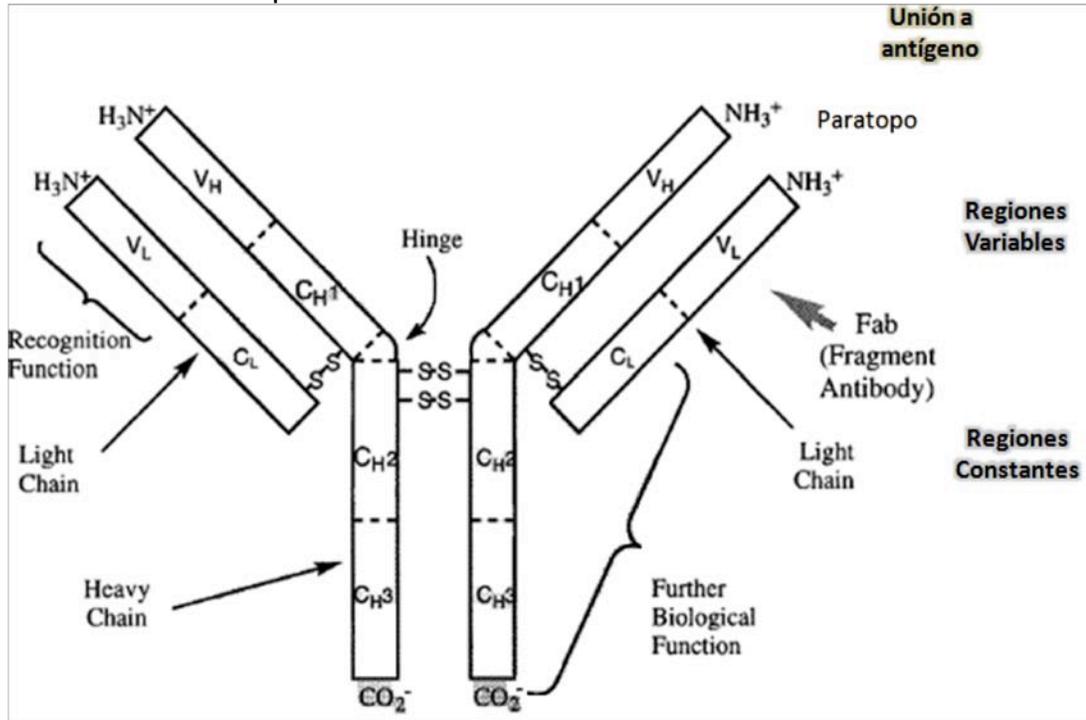


Figura 5. Componentes estructurales de las inmunoglobulinas (IgG). Dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos cadenas ligeras idénticas (L). Estas se encuentran unidas mediante puentes disulfuro. Modificado de (8)

A estos dominios N-terminales, se les denomina dominios o regiones variables (V), debido a que contienen secuencias de aminoácidos no conservadas, lo que les permite la formación de distintos sitios de unión de antígeno. Los otros dominios son llamados constantes (C), ya que su secuencia es conservada [7]. La variabilidad del dominio N-terminal asegura la existencia de una amplia variedad de anticuerpos capaces de reaccionar con un número amplio de diferentes antígenos, mientras que los dominios conservados de otras partes de la molécula aseguran que las reacciones apropiadas sean desencadenadas por la unión de cualquier tipo de antígeno [28].

De manera que los sitios de unión con el antígeno, están asociados a los dominios V_L y V_H , mientras que las funciones efectoras de la molécula están asociadas a los dominios constantes de las cadenas pesadas (H).

En la región Fab (fragmento de unión al antígeno), las estructuras **VL y VH** se encuentran en asociación cercana y **sus interacciones son generalmente hidrofóbicas**, así, **los aminoácidos encontrados en el interior, así como aquellos residuos de la interface, tienen naturaleza hidrofóbica, y son más conservados que aquellos que se encuentran expuestos al solvente** [28].

Por su parte, muchos de los **aminoácidos conservados**, tienen una función **estructural**. Por ejemplo, las **cisteínas** en las posiciones 22 y **96** en la región **VH**, y las 23 y 88 en la región VL, forman **puentes disulfuro**, que juegan un papel determinante en el mantenimiento de la integridad de los dominios estructurales en las regiones variables (V) (**ver discusión página 53**).

Por otro lado, la glicina en la posición 16 del dominio VL, (Gly16VL), la prolina en la posición 14 en la región VH, así como la secuencia de Pro-Gly, que comúnmente se encuentra en las posiciones 41-42 en la cadena VH, así como las posiciones 40-41 en la cadena VL, podrían estar involucrados en la formación de horquillas tipo β , las cuales se observan en estas regiones de los dominios variables [28].

3.3.2 Regiones hipervariables

Las regiones hipervariables (extremo N-terminal), se encuentran formadas por la asociación de las láminas beta que integran los dominios variables tanto de las cadenas pesada (VH), como ligera (VL). Éstas regiones o dominios variables de aproximadamente 110 aminoácidos, son distintos en cada anticuerpo [29].

Respecto a su localización, se sabe que estas regiones se encuentran entre los siguientes residuos:

- En la cadena ligera: la región L1 se encuentra entre los residuos (23-34) [29]; 26-32 (Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) L1) [8]; L2 entre 50-56 [29], 50-52 (CDR L2) [8]; y L3 entre 89-97 [29], 91-96 (CDR L3) [8].
- Para el caso de la cadena pesada: los residuos 31-35 comprenden la región H1 [29], 26-32 (CDR H1) [8]; la región H2 se encuentra entre los residuos 49-66 [29], 52-55 (CDR H2) [8]; mientras que la región H3 entre los residuos 99-104 [29], 96-101 (CDR H3) [8].

Así, los CDRs, son los principales responsables del reconocimiento antigénico. Estas regiones hipervariables, están formadas por asas, localizadas en los extremos amino terminales de los dominios variables (V) de los anticuerpos [29]. La figura 6 ilustra las asas de estas Regiones Determinantes de Complementariedad:

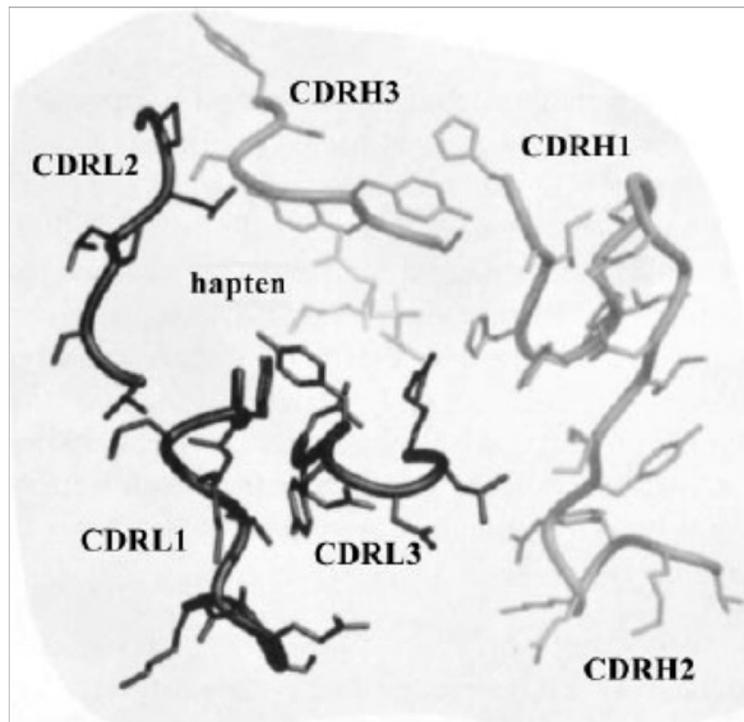


Figura 6. Esquema representativo de las Regiones Determinantes de Complementariedad o CDRs, principales determinantes del reconocimiento antigénico en inmunoglobulinas. Como puede observarse existen tres asas para cada región de la inmunoglobulina (pesada y ligera) (28).

Sin embargo, aunque el sitio de unión antigénico está formado en su mayoría por CDRs, no todas las CDRs en un anticuerpo participan en interacciones con el antígeno.

En general los dominios variables, ya sean de cadenas pesadas o ligeras, aun cuando pertenezcan a diferentes clases, presentan la misma estructura básica, de forma que las diferencias principales entre ellos, ocurren en las asas que contienen las regiones hipervariables [28].

Se sabe además, que los CDRs, forman una cavidad profunda en donde puede unirse el antígeno. Esta cavidad está formada por las regiones: H1, H2 y H3 (de la cadena pesada), así como la región L3 (de la cadena ligera). Aunque L1 contribuye a la formación de la cavidad, ésta lo hace de una manera indirecta, estabilizando la región H3 a través de contactos extensivos con ésta y con el resto de la estructura [28].

3.3.3 Fuerzas que contribuyen a la especificidad y afinidad hapteno-anticuerpo

Se sabe que las fuerzas que contribuyen a la especificidad y afinidad hapteno-anticuerpo, son similares a aquellas presentes en las interacciones proteína-ligado, principalmente interacciones de Van der Waals y fuerzas electrostáticas.

Otro aspecto importante a la unión del hapteno con el anticuerpo (anticuerpos anti-hapteno), es la naturaleza química del sitio de unión. El proceso de unión se encuentra asociado con una pérdida entrópica significativa, esto debido a la pérdida de grados de libertad conformacionales, rotacionales, vibracionales y traslacionales, por parte de los residuos de aminoácidos presentes en los sitios de unión. De forma que, estos eventos desfavorables en cuanto a la entropía de asociación, son compensados por la entalpía de asociación (un ΔH negativo es característico de un proceso exotérmico o formador de enlaces, $\Delta H = H_p - H_s$, $H_p < H_s$: proceso formador de enlaces). (Ver discusión página 27)

Para poder contar con estas condiciones termodinámicas (valores entálpicos, entrópicos y de energía libre) favorables, los sitios de unión de los anticuerpos presentan ciertos aminoácidos preferentemente, como son tirosina, triptófano, asparagina y serina. Los residuos aromáticos cuentan con un menor número de grados de libertad conformacionales, y por lo tanto sus reacciones de unión a haptenos tienen un costo entrópico menor, pudiendo además participar en interacciones específicas, como puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas. Así, los sitios de unión a antígenos de los anticuerpos, presentan aminoácidos cuyas cadenas laterales sean lo suficientemente (estructural y funcionalmente) flexibles, como para permitir su alteración con una mínima pérdida de entropía [31]. Además, los aminoácidos triptófano y tirosina, a través de su habilidad para tomar diferentes conformaciones, imparten al sitio de unión a anticuerpos, la capacidad para variar su geometría. Los residuos con cadenas laterales alifáticas, tienen menor propensión a participar en interacciones en los sitios de unión [30]. (Ver discusión págs. 53-55).

Se conoce que los principales factores implicados en uniones a sustrato, se basan en redes intrincadas de puentes de hidrógeno (en ambos sitios polares de las cadenas laterales de aminoácidos), además de estabilizaciones de Van der Waals, por contactos entre anillos aromáticos. Así, los sitios de unión, deben poseer aminoácidos posicionados de manera precisa, a manera de tomar ventaja de todas las interacciones electrostáticas existentes, de puentes de hidrógeno y de Van der Waals [31].

3.4 ANTICUERPOS CATALÍTICOS

Debido a que el reconocimiento inmune se basa en la complementariedad estructural y química antígeno-anticuerpo, la inmunización con una molécula templado adecuada, puede dar origen a anticuerpos que exhiban propiedades de enzimas, como son: la capacidad para acelerar velocidades de reacción, especificidad de sustrato, así como regio-estereoselectividad [6].

Los sitios de unión a antígeno que poseen los anticuerpos, presentan las dimensiones de un sitio activo enzimático típico, tendiendo a ser ricos en triptófanos y tirosinas principalmente, además de asparaginas e histidinas [6]. Debido a la presencia de cadenas laterales de aminoácidos altamente reactivas, existen de manera natural anticuerpos capaces de modificar químicamente los ligandos que unen (como es el caso de la albúmina sérica [6]).

La habilidad de encontrar anticuerpos con propiedades catalíticas puede incrementarse si se utiliza para inducir la respuesta inmune, una molécula con "información química" de una reacción en particular. Un análogo del estado de transición de la reacción en particular, sería un inmunógeno ideal. Así, los anticuerpos seleccionados para unir fuertemente a un análogo del estado de transición de una reacción en específico, serían capaces de llevar a cabo la conversión del sustrato en producto [6].

3.4.1 Estado de transición de una reacción

En 1946, Linus Pauling propuso que la razón principal por la cual las enzimas son capaces de catalizar una reacción química, es debido a que complementan y estabilizan el estado de transición de la reacción, de forma que su unión a este estado, es mucho más fuerte que su unión a reactantes o productos [32] (figura 7).

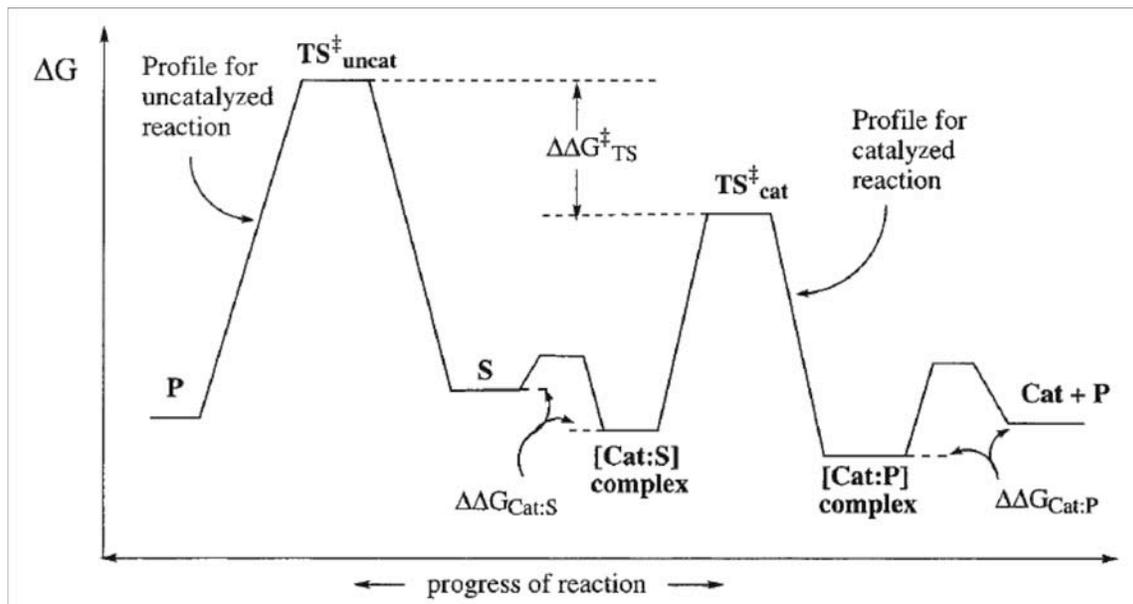


Figura 7. Diagrama del perfil energético de una reacción. Como se indica, la catálisis se lleva a cabo mediante la disminución de la energía libre de activación del proceso, de forma que la enzima debe unirse más fuertemente al estado de transición de la reacción que a los reactantes o productos (8).

De forma que **entre mayor sea la afinidad de la enzima hacia el estado de transición, en comparación con su afinidad por el sustrato o producto, mayor será el incremento en la velocidad de reacción enzimática** [11].

Este principio ha sido base para el desarrollo de análogos al estado de transición de reacciones específicas, a partir de los cuales, es posible explotar la afinidad que poseen con las enzimas.

Así, el principio básico en catálisis enzimática es, disminuir la energía de activación de la reacción, incrementando así su velocidad (figura 8).

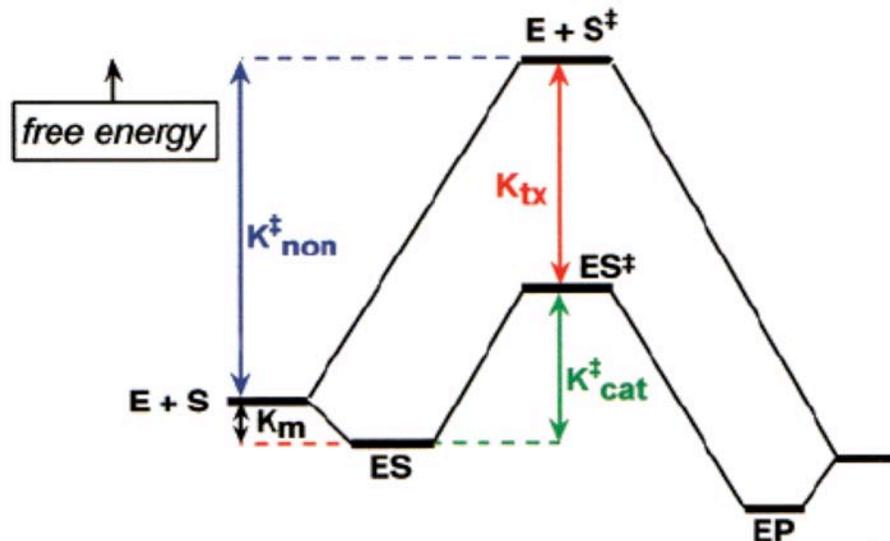


Figura 8. Esquema de las constantes cinéticas involucradas en la catálisis enzimática (11).

En la figura 8 se expresan las constantes cinéticas involucradas en la catálisis enzimática. K_{tx} expresa la constante de disociación del complejo enzima-sustrato en el estado de transición (ES^{\ddagger}), la cual es comparable con la constante de Michaelis-Menten (K_m) para el complejo ES, en el estado basal. k_{cat} y k_{non} , expresan las constantes de velocidad para el proceso catalizado y no catalizado, respectivamente.

Como es sabido, los estados de transición involucran especies altamente energéticas, cuyos enlaces químicos pueden no estar completamente formados, lo cual dificulta su estudio. Por esto, la femtoquímica de láser y las predicciones estructurales, han sido utilizadas para su análisis [8]. Estas técnicas están basadas en cálculos de orbitales moleculares, sin embargo no en todos los casos se logran resultados satisfactorios. Debido a la inestabilidad implícita del estado de transición de una reacción, solo se han creado moléculas análogas (TSA), pero que son estables.

El diseño de análogos del estado de transición, tiene su base en el postulado de Hammond. El postulado de Hammond menciona, que si existe un intermediario

inestable en el mecanismo de reacción, el estado de transición de la reacción presentará la misma estructura que este intermediario [33].

En base al postulado de Linus Pauling, William P. Jencks en 1969, propuso la idea de **crear una enzima mediante el uso de anticuerpos**, los cuales fueran creados mediante la utilización de un hapteno (sustancia química de bajo peso molecular que puede inducir la respuesta inmune cuando se encuentra acoplado a una proteína transportadora) específico, cuya estructura mimetizara el estado de transición de la reacción particular [35].

Sin embargo, la idea de la generación de anticuerpos catalíticos no pudo ser desarrollada sino hasta 18 años después, debido a dificultades en el aislamiento y purificación de los anticuerpos con la propiedad deseada. Fue hasta 1986, que los grupos de Alfonso Tramontano y Peter Shultz, reportaron independientemente las primeras catálisis llevadas a cabo por anticuerpos, los cuales eran capaces de hidrolizar aril-ésteres y carbonatos, utilizando como análogos del estado de transición, ésteres de monoaril fosfonatos [3, 34].

3.4.2 Bases de los anticuerpos catalíticos

Uno de los aspectos en las enzimas que contribuyen a su eficacia, es su habilidad para reorganizar los reactantes para la reacción. La excelente complementariedad observada en los complejos antígeno-anticuerpo, sugieren que esta energía de unión podría ser explotada, imitando la acción de las enzimas [6].

El concepto básico de los anticuerpos fue propuesto en 1969 por William P. Jencks [35]. Su idea principal consistió en generar la respuesta inmune mediante la utilización de un análogo del estado de transición, de manera que los anticuerpos resultantes tuvieran sitios de unión a antígenos, que forzarían al sustrato unido a adoptar las propiedades geométricas y estereoelectrónicas del estado de transición.

La manera en la que William P. Jencks lo explica, es la siguiente:

*"El sitio activo de una enzima, tiene una complementariedad perfecta con el sustrato, de forma que sólo los sustratos específicos son capaces de unirse a este sitio. En el caso de la conformación del producto, éste posee una conformación distinta a la del sustrato, de forma que la reacción se vería favorecida nuevamente hacia la formación del mismo. Es aquí donde entra precisamente el concepto de **estado de transición**, ya que éste encaja exactamente en el sitio activo de la enzima, de forma que su unión no conllevaría gasto energético alguno, dando como resultado una disminución en la energía de activación de la reacción, siendo de esta forma, la complementariedad entre el sitio activo y el estado de transición, lo que conlleva a la formación del producto, y contribuye a la catálisis enzimática". [35]*

Discutiendo también lo siguiente:

"Si la complementariedad entre el sitio activo y el estado de transición es lo que contribuye en mayor medida a la catálisis enzimática, entonces, es posible sintetizar una enzima mediante la construcción del sitio activo".

Así, enunciando de esta forma la idea de los anticuerpos catalíticos actualmente:

"Una manera de hacer esto, es inducir la formación de un anticuerpo respecto a un hapteno específico, el cual se parezca en estructura al estado de transición de la reacción dada. El sitio de combinación de dicho anticuerpo, sería entonces complementario al estado de transición, y provocaría una aceleración en la reacción, mediante el forzado de los sustratos unidos, a emular el estado de transición". [35]

En el campo de los anticuerpos catalíticos, los **haptenos son diseñados racionalmente** y utilizados a manera de moléculas estables que mimetizan la estructura del estado de transición de la reacción deseada, generando así, **anticuerpos con sitios de unión a antígenos, con la topología y el ambiente estereoelectrónico adecuados para la catálisis.**

3.4.3 El anticuerpo catalítico 1F7

En 1988, el laboratorio del Dr. Donald Hilvert realizó una selección de anticuerpos monoclonales con actividad de corismato mutasa, utilizando como hapteno, un compuesto análogo al estado de transición de dicha reacción [9].

La enzima corismato mutasa cataliza la conversión de corismato en prefenato, el cual constituye un rearreglo Claisen, de gran importancia biológica. Éste tipo de transformaciones constituyen reacciones de condensación de carbonilos, que se caracterizan por la condensación de dos moléculas de éter, de las cuales una de ellas reacciona con una base para dar un ion enolato nucleofílico, el cual reacciona posteriormente con la segunda molécula de éter, en una sustitución nucleofílica de acilos [37]. Esta transformación es clave en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en bacterias, hongos y plantas superiores. La enzima responsable de llevar a cabo esta reacción es la corismato mutasa (figura 9).

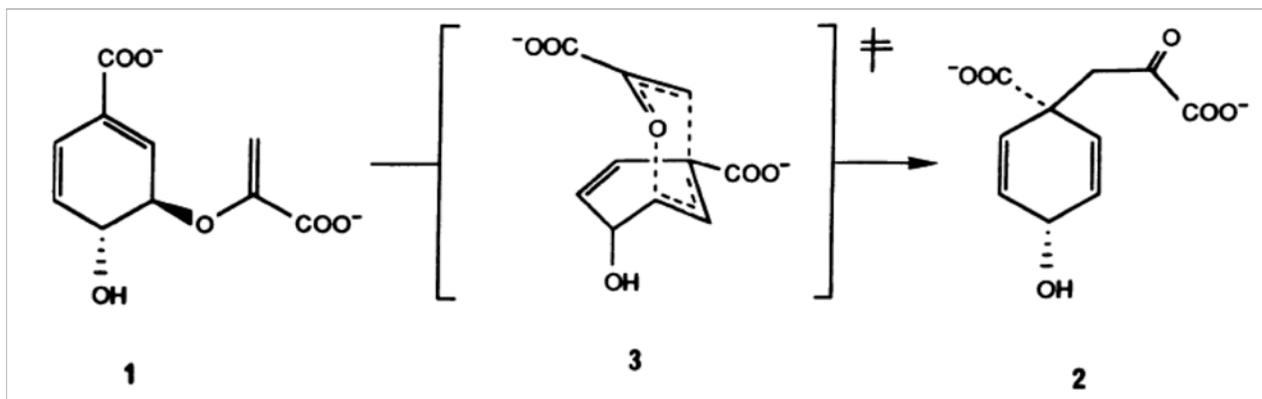


Figura 9. Rearreglo Claisen que cataliza la enzima corismato mutasa, de conversión de corismato (1) en prefenato (2), que forma parte de la ruta biosintética de la tirosina. El estado de transición de la reacción se muestra en (3). (9)

En el trabajo realizado por Donald Hilvert y colaboradores [9], se utilizó un compuesto análogo al estado de transición de esta reacción (figura 10), como hapteno para la creación de anticuerpos monoclonales capaces de catalizar la conversión de corismato en prefenato.

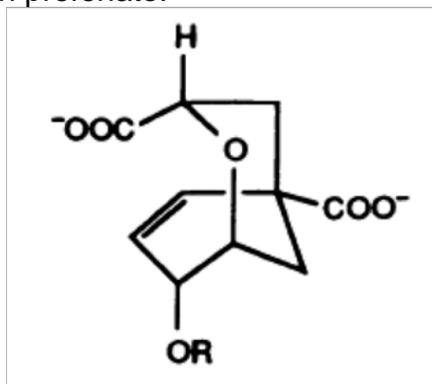


Figura 10. Esquema del análogo del estado de transición de la conversión de corismato en prefenato. Constituye el compuesto oxabicyclico utilizado en 1988 para la creación del anticuerpo catalítico 1F7, con actividad de corismato mutasa (9).

El compuesto presentado en la figura 10, es el análogo al estado de transición de la conversión de corismato en prefenato. Este compuesto fue sintetizado con el fin de ser utilizado a manera de hapteno, para inducir la respuesta inmune generadora de anticuerpos capaces de unirse fuertemente a este compuesto, de manera que este hapteno es un buen inhibidor de la actividad de corismato mutasa (inhibición competitiva), con una afinidad de unión a la enzima 100 veces mayor que la del sustrato (K_i 1F7=0.6 μ M) [9]. Los resultados presentados por Lee y Ganem [38], muestran que el corismato es un sustrato pobre para el anticuerpo catalítico 1F7, presentando un estimado de enantioselectividad en la catálisis cercano a 90:1.

En el trabajo del Dr. Donald Hilvert [9], se aislaron 15 anticuerpos a partir de un total de 46 anticuerpos iniciales, de los cuales el anticuerpo 1F7 presentó la mayor aceleración en la velocidad de conversión de corismato en pefenato, respecto al proceso no catalizado ($k_{cat}/k_{un}=190$).

Temp (°C)	$k_{cat} \times 10^3$ 1/seg	$K_m \times 10^5$ M	k_{cat}/K_m 1/M seg	k_{cat}/K_{un}
14.0	0.39	4.9	8.0	250
25.0	1.2	5.1	24	190
36.0	2.5	3.8	66	110

Cuadro 1. Parámetros cinéticos del anticuerpo catalítico 1F7, a diferentes temperaturas. Tabla basada en (9).

Como se muestra en la figura 15, los parámetros catalíticos de 1F7 indican una k_{cat} de 1.2×10^{-3} 1/seg y una K_m de 5.1×10^{-5} M, a 25°C.

El anticuerpo 17E8 con actividad de serin-proteasa [51], presenta arreglos de grupos catalíticos parecidos a aquellos encontrados en enzimas naturales. El análisis de la estructura cristalográfica de 17E8 y experimentos cinéticos, han demostrado que el mecanismo de hidrólisis (es un anticuerpo hidrolítico activo) es similar al mecanismo encontrado en las serin-proteasas. De hecho, específicamente, el sitio de unión a antígenos contiene dos residuos ($\text{His}^{\text{H}35}$ y $\text{Ser}^{\text{H}95}$), que parecen ser componentes equivalentes a la tríada catalítica (Ser-His-Asp), presente en las serin-proteasas [39].

3.4.3.2 Sitio activo de 1F7

Por su parte, la complementariedad de la región de unión al antígeno de 1F7 con el hapteno, es dada en gran medida debido a una **red de contactos de Van der Waals e interacciones electrostáticas específicas**, como se muestra en la figura 11:

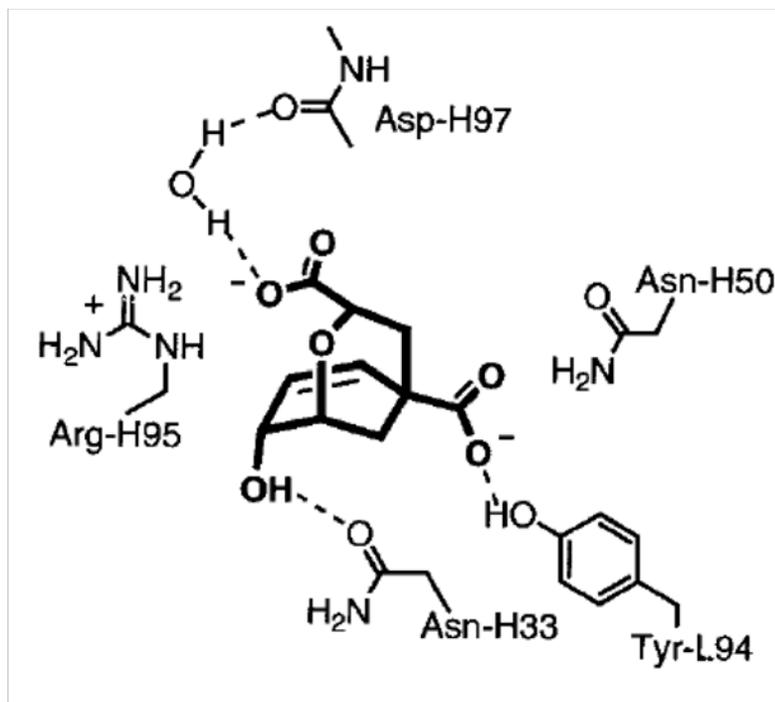


Figura 11. Residuos presentes en el sitio de unión a hapteno del anticuerpo catalítico 1F7. Se muestran las interacciones electrostáticas y de puentes de hidrógeno con el análogo al estado de transición (23).

El análogo al estado de transición, se une en un pequeño hueco presente en una superficie inusualmente plana de la región de CDRs [23].

Estudios posteriores en el laboratorio del Dr. Donald Hilvert del fragmento Fab del anticuerpo catalítico 1F7, en unión con su hapteno [10], mostraron que la unión se encuentra mediada por una **combinación de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno.**

También se encontró que **el hapteno interactúa principalmente con la cadena pesada del fragmento variable (V_H).** Los CDRs con los que interactúa principalmente son: **CDR H3**, a través de los residuos Arg⁹⁵, Ala⁹³, Tyr¹⁰⁰ y Phe^{100b} (4 residuos); **CDR H1**, en los residuos Asn³⁵ y Asn³³ (2 residuos) y **CDR H2**, en Asn50 (un residuo) [10].

En base a estos análisis también se determinó, que el *piso* del sitio de unión en 1F7, estaba integrado por los aminoácidos: Asn^{H35}, Trp^{H47}, Ala^{H93}, Phe^{H100b} y Leu^{L96}, lo cual provee de una **base hidrofóbica** para la cavidad. Por su parte, las *paredes* de la cavidad están integradas por residuos polares, como: Asn^{H33}, Asn^{H50}, Asn^{H58}, Arg^{H95} y Tyr^{L94}, los cuales forman interacciones con el solvente [10].

Así, las cadenas laterales de los residuos polares, forman la *pared* de la cavidad, mientras que los residuos hidrofóbicos forman el *piso* de este sitio de unión. Respecto a los contactos específicos, se sabe que el grupo carboxilo del C-10 (carbono 10) del hapteno, forma puentes de hidrógeno con el residuo Y^{94L} (cadena ligera), así como con otras cadenas polares, formando una red de puentes de hidrógeno que deslocaliza las cargas negativas del sitio.

Por su parte, el grupo carboxilo del C-11 (que se encuentra *enterrado* en la cavidad), forma un puente de hidrógeno con una molécula de agua, la cual se encuentra a su vez formando un puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo del grupo Asp^{97H} (D^{97H}, aspartato residuo 97 de la cadena pesada), y existiendo además una interacción con el residuo Arg^{95H}, lo cual neutraliza su grupo carboxilo [10].

Otro punto importante recae en la cadena lateral del residuo Arg^{H95} (como parte de la CDR H3). Ésta participa *protegiendo* al ligando del solvente, de manera que la disociación del análogo del estado de transición del pocket de unión del anticuerpo, necesita de un cambio conformacional de la cadena lateral de este residuo de Arg^{H95} [23]. Por su parte, **el grupo hidroxilo del C-4**, debido a que se encuentra localizado en la *boca* del pocket de unión, encontrándose por lo tanto altamente expuesto al solvente, participa en la formación de puentes de hidrógeno con la cadena lateral del **aminoácido Asn^{H33}** (**ver Antecedentes pág. 4 y Discusión pág. 79**), lo cual podría contribuir tanto a la afinidad como a la especificidad de este sitio de unión.

Aunque no se encuentran cargas formales positivas en el sitio de unión al antígeno, una **red de puentes de hidrógeno**, generada a lo largo de las cadenas laterales de los residuos: **Tyr^{L94}**, **Asn^{H35}**, **Trp^{H47}**, **Asn^{H50}** y **Asn^{H58}**, (ver **figura 20**) podría ayudar a distribuir las cargas y neutralizar las cargas negativas existentes [23].

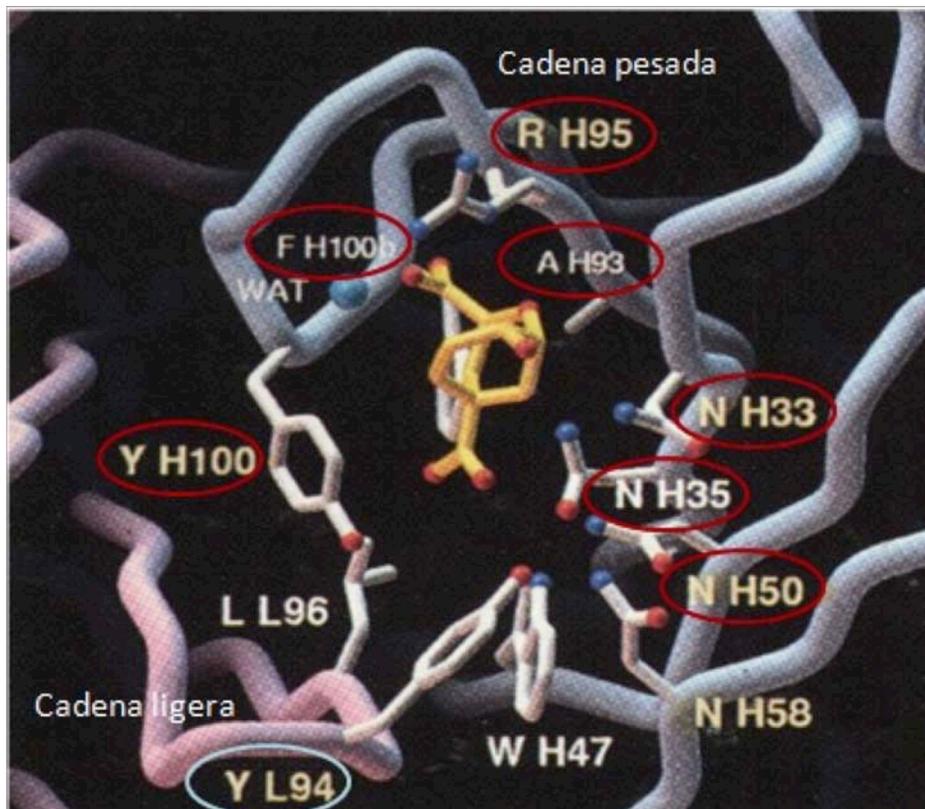


Figura 12. Muestra el sitio de unión al antígeno de 1F7, en unión con su hapteno (TSA). Los residuos: Asn^{H35}, Trp^{H47}, Asn^{H50} y Asn^{H58} en VH, señalados en rojo, forman una **red de puentes de hidrógeno**. El dominio VL sólo hace contacto con el TSA mediante Y^{L94}. Modificado de (10).

De forma que, como se indicará más adelante, en el caso de la enzima natural corismato mutasa, **la localización adecuada de cargas electrostáticas que estabilicen el estado de transición, es sumamente importante para una catálisis adecuada.**

3.5 CORISMATO MUTASA

La enzima corismato mutasa (5.4.99.5), participa en la vía de producción del ácido shikímico, a partir del cual se producen los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina [25, 40]. Para muchos organismos, la enzima corismato mutasa es un punto importante de regulación de la síntesis de aminoácidos aromáticos en la célula. Esta enzima cataliza el rearrreglo unimolecular de corismato a pefenato, el cual constituye un rearrreglo Claisen. Existen aún controversias respecto a si este rearrreglo involucra una catálisis electrofílica, nucleofílica (generando intermediarios covalentes) o simplemente como un proceso pericíclico [40]. El cuadro 2 muestra los parámetros catalíticos de distintas enzimas corismato

mutasas, de acuerdo a lo publicado por Herschel Wade y Thomas S. Scalan en 1997 [29]:

corismato mutasa	kcat (1/seg)	KM (μM)	kcat/kuncat	Ki (μM)
<i>B. subtilis</i>	50	100	2×10^6	3
<i>E. coli</i>	72	40	2×10^6	0.3
IgG 1F7	0.0012	290	250	0.6
IgG 11F1-2E11	0.45	51	1×10^4	9

Cuadro 2. Parámetros catalíticos de enzimas corismato mutasa de diferentes organismos, además de los anticuerpos catalíticos 1F7 y 11F1-2E11. Figura basada en (29).

Por su parte, el grupo del Dr. Hilvert (Kast, et.al.,1996), reportó los siguientes datos termodinámicos, de diferentes enzimas y el anticuerpo catalítico 1F7 [41] (Cuadro 3).

Fuente de actividad de corismato mutasa	ΔG^* (kcal/mol)	ΔH^* (kcal/mol)	ΔS^* (cal/mol $^\circ\text{K}$)
Reacción no catalizada	24.5	20.7	-12.9
<i>Bacillus subtilis</i>	15.4	12.7	-9.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16.2	15.9	-1.1
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	15.0	14.5	-1.6
Anticuerpo catalítico 11F1-2E11	18.7	18.3	-1.2
Anticuerpo catalítico 1F7	21.6	Δ 15	Δ -22

Cuadro 3. Parámetros termodinámicos de distintas corismato mutasas, y de los anticuerpos catalíticos 1F7 y 11F1-2E11. Figura basada en (41).

El anticuerpo catalítico 1F7, presenta la contribución entrópica más desfavorable de las comparadas (-22 cal/mol $^\circ\text{K}$). Sin embargo, su contribución entálpica es mejor que en el caso del anticuerpo catalítico 11F1-2E11, y comparable con las entalpías existentes en las enzimas de *Streptomyces aureofaciens* y de *Klebsiella pneumoniae*. Se hipotetiza que esta contribución entálpica favorable, es la responsable del incremento en la velocidad de reacción respecto al proceso no catalizado, presentado por el anticuerpo 1F7.

3.5.1 Sitio activo de corismato mutasa

Las características del sitio activo de corismato mutasa en comparación con 1F7, son las principales determinantes en la diferencia en velocidades de reacción encontradas [10]. Debido a esto, a continuación se muestran las características de sitios activos de distintas enzimas corismato mutasas.

En el caso de la enzima corismato mutasa de *E. coli*, su sitio activo se encuentra altamente cargado por una pared electropositiva, integrada principalmente por residuos de lisina y arginina. Esto ayuda a promover la estabilización y la unión de la conformación reactiva del sustrato, así como a estabilizar el estado de transición dipolar. Esta pared electropositiva, interactúa principalmente con el C-12 (ya sea del sustrato o del hapteno (el análogo al estado de transición de la reacción en el caso del anticuerpo 1F7)), además de participar en la formación de puentes de hidrógeno con el O-7 de dicho sustrato [23], (figura 13).

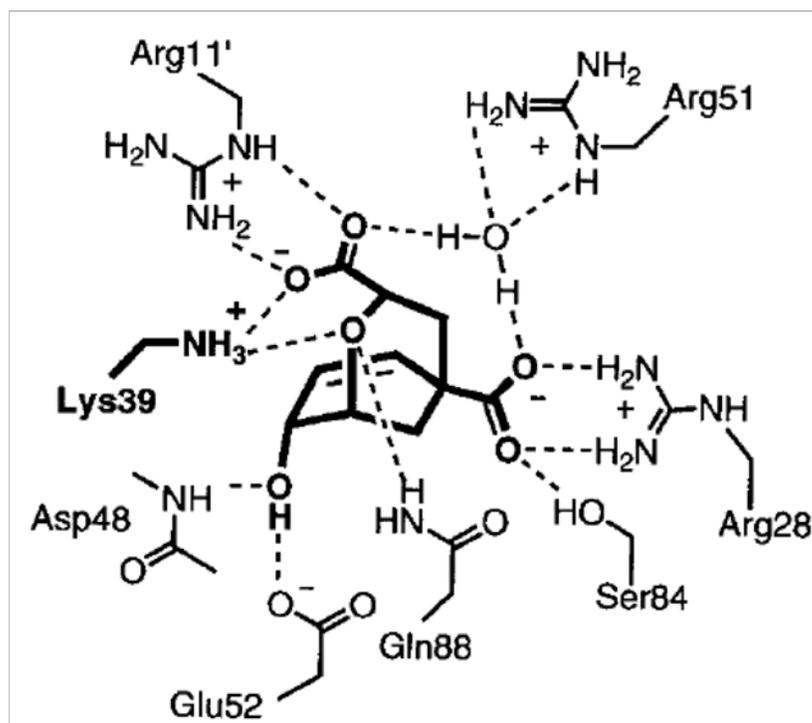


Figura 13. Esquema del sitio activo de la enzima corismato mutasa de *E. coli*. Se indican los residuos que interactúan con el análogo al estado de transición (23).

La figura 13 muestra el posicionamiento de los residuos cargados positiva y negativamente, que permiten estabilizar las cargas parciales positivas del estado de transición dipolar, dando como resultado una reducción en la barrera energética, en una proporción igual a 7 kcal/mol [29].

En la figura 14 se muestra el sitio activo de corismato mutasa de *B. subtilis* (BsCm), indicando el papel del residuo Arg90 en la estabilización de las cargas negativas del corismato [23]:

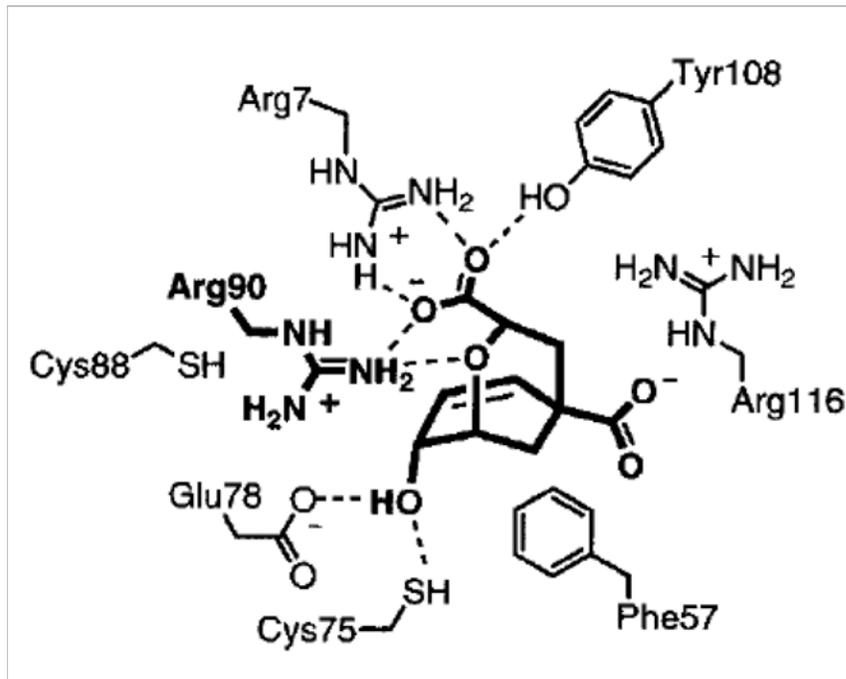


Figura 14. Esquema del sitio activo de la enzima corismato mutasa de *B. subtilis* (23).

La figura 15 muestra el sitio activo de corismato mutasa de *S. cerevisiae* (ScCM) [23]:

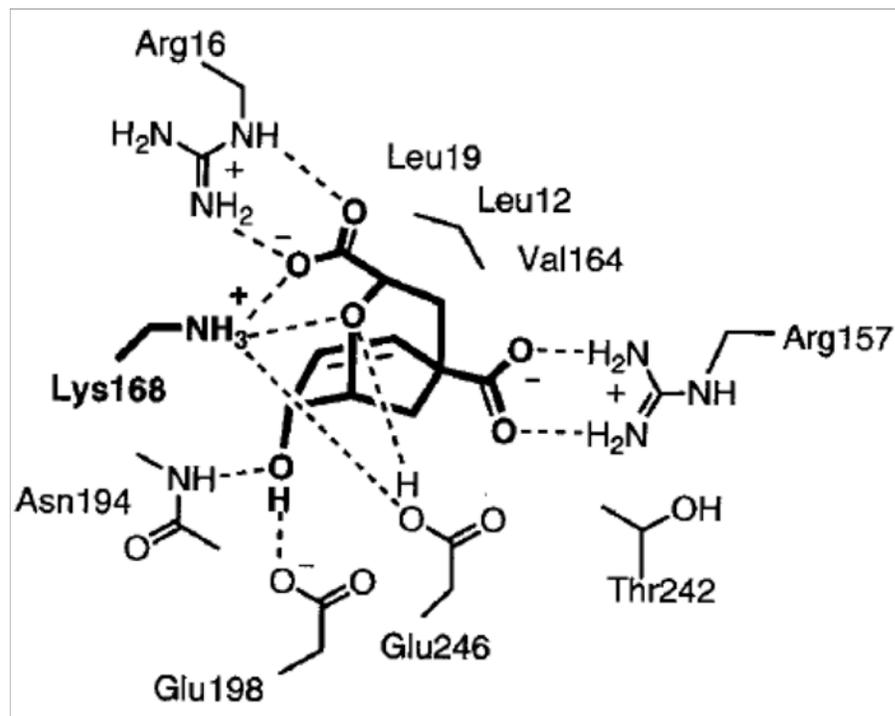


Figura 15. Esquema de sitio activo de la enzima corismato mutasa de *S. cerevisiae* (23).

Como se puede observar en la figura 15, el residuo Arg90 en BsCM, es sustituido por Lys168 en ScCM (figura 16) y Lys39 en EcCM (figura 14), las cuales estabilizan la carga negativa del oxígeno del éter del sustrato [23].

Estudios cristalográficos del sitio activo de corismato mutasa de *Bacillus subtilis* en presencia del análogo del estado de transición, permitieron descifrar el mecanismo de reacción de esta enzima [40]. Existen específicamente **25 contactos (incluyendo 7 puentes de hidrógeno)** entre la cadena lateral enol-pirúvica del estado de transición de corismato, y la enzima. Estas interacciones incluyen puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de los aminoácidos Arg7, Arg90, y Tyr80, y el carboxilato del corismato, así como puentes de hidrógeno entre la cadena lateral de Arg90 y el oxígeno éter del corismato [23]. Esto permite alcanzar una aceleración de la reacción de 10^6 veces respecto al proceso no catalizado.

3.5.2 Comparación BsCM con 1F7

El anticuerpo catalítico 1F7 presenta una catálisis altamente regioselectiva y estereoespecífica [38]. El sitio activo de la enzima corismato mutasa, difiere del sitio de unión del anticuerpo catalítico 1F7, principalmente en la naturaleza de las interacciones electrostáticas y el número de contactos existentes con el hapteno o análogo del estado de transición [10]. La figura 16 compara éstas interacciones.

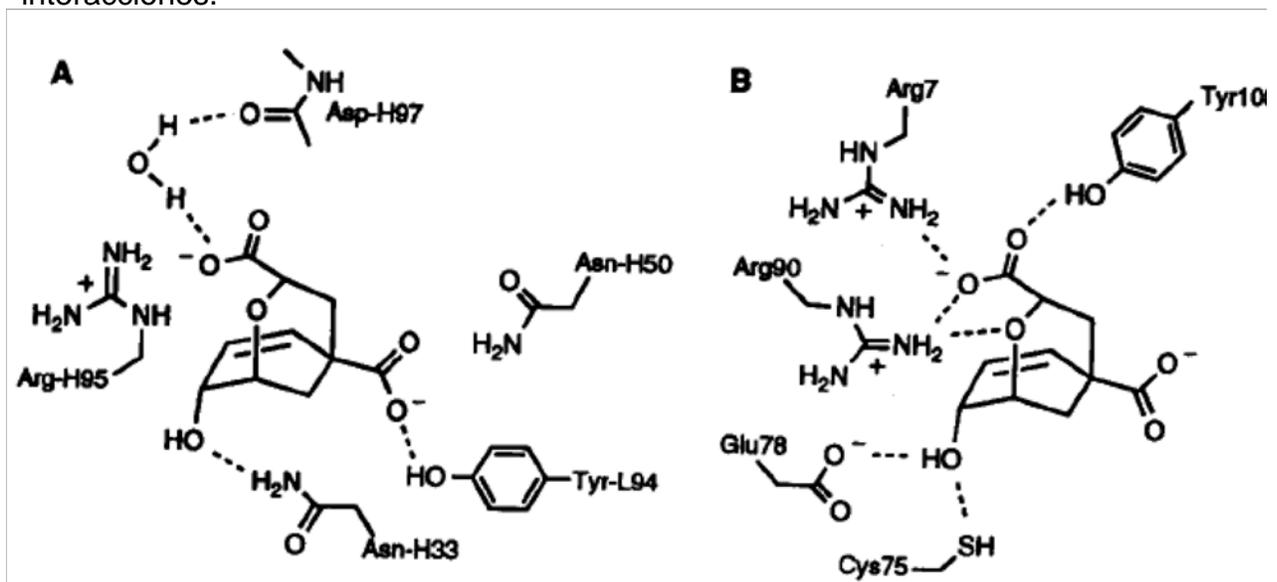


Figura 16. Comparación de interacciones electrostáticas y de puentes de hidrógeno, en los sitios activos de 1F7 y BsCM, con el análogo al estado de transición, para el caso de: A) el anticuerpo catalítico 1F7, y B) la enzima corismato mutasa de *B.subtilis* (BsCM) (10).

Como se puede observar, existen diferencias en la orientación del análogo al estado de transición, entre el anticuerpo y la enzima. También son distintas la naturaleza y el número de interacciones específicas que median el reconocimiento de ligando. En general, existe un mayor número de interacciones electrostáticas y de puentes de hidrógeno con los grupos funcionales clave del sustrato, en la cavidad del sitio activo de la enzima natural.

La **enzima** cuenta con **mayor número de residuos cargados** en contacto con el sustrato (incluyendo dos residuos de arginina (Arg⁹⁰, Arg⁷) y uno de glutamato (Glu⁷⁸), para el caso de la enzima corismato mutasa de *Bacillus subtilis* (BsCM) [38]), en comparación con el único residuo de arginina (Arg^{H95}), encontrado en el sitio de unión al hapteno de 1F7.

De manera que, la enzima provee de más interacciones de puentes de hidrógeno con los grupos funcionales clave del hapteno, que el anticuerpo, teniendo además un mayor número de residuos cargados para la unión, incluyendo dos argininas positivas y un glutamato cargado negativamente, en comparación con un solo residuo de arginina existente en el sitio activo del anticuerpo [10].

También la diferencia en orientación del análogo al estado de transición (TSA) en la enzima y el anticuerpo, puede relacionarse con la diferencia en la eficiencia catalítica [10].

Una diferencia adicional entre la enzima y el anticuerpo 1F7, es en que el sitio de unión a hapteno del anticuerpo no es dipolar, en contraste con la naturaleza dipolar del sitio activo de la enzima corismato mutasa de *E. coli*. Así, en la enzima, el grupo guanidino de Arg⁹⁰, se encuentra razonablemente posicionado a 3.1Å del grupo carboxilo del C-11 y del oxígeno éter del hapteno, para la estabilización electrostática de la carga parcial negativa que se desarrolla en el oxígeno del éter. De manera similar, la cadena lateral cargada negativamente (carboxilato) del Glu⁷⁸, podría complementar la carga parcial positiva desarrollada en el anillo ciclohexadienil del hapteno. **Por su parte en 1F7, el grupo guanidino de Arg^{H95}, podría jugar un papel similar que el residuo Arg⁹⁰ en la enzima, de manera que el sitio de unión a hapteno del anticuerpo carece de un análogo a Glu⁷⁸ en la enzima, para la estabilización de la carga positiva del anillo ciclohexadienilo del hapteno.** (Haynes and Hilvert, et. al., 1994) [10].

3.6 PREFENATO DESHIDROGENASA

Prefenato deshidrogenasa forma parte de la proteína bifuncional T de *E. coli*, un homodímero de 373 aminoácidos que presenta actividad de prefenato deshidrogenasa (TyrA_{Ec}) y de corismato mutasa (AroQ_T). Ambas actividades enzimáticas forman parte de la ruta biosintética de la tirosina. Prefenato

deshidrogenasa de *E. coli*, forma parte de la familia de proteínas TyrA que convierten p-hidroxifenilpiruvato en p-hidroxifenilpiruvato, utilizando únicamente p-hidroxifenilpiruvato como sustrato [42]. Las figuras 17 y 18 muestran las estructuras dimérica y monomérica de PDH de *Haemophilus influenzae*, respectivamente [42].

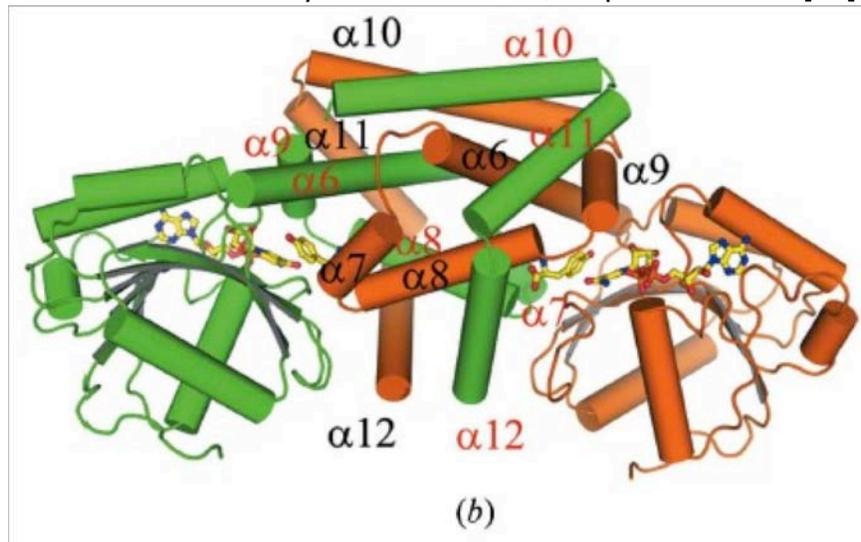


Figura 17. Diagrama de cintas de la estructura dimérica de PDH de *Haemophilus influenzae* (42).

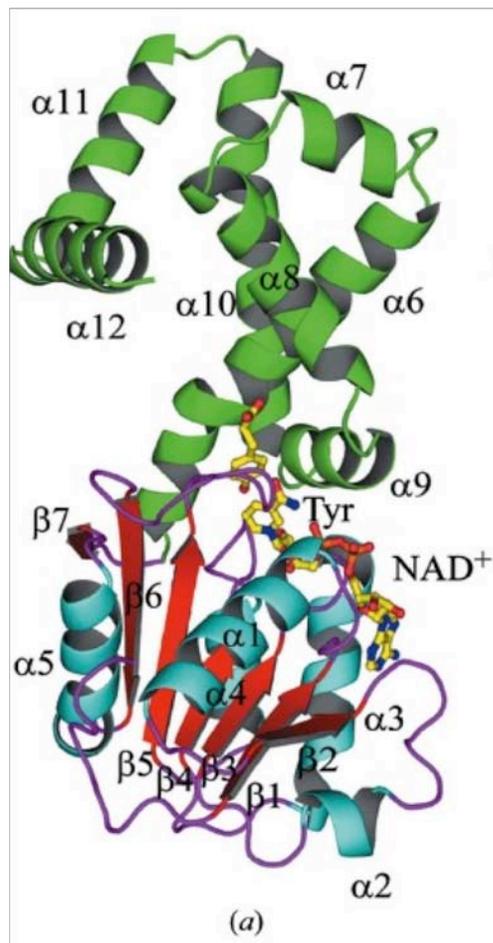


Figura 18. Diagrama de cintas de la estructura monomérica de PDH de *Haemophilus influenzae*, unido a NAD⁺ y tirosina (42).

Cada monómero de pterfenato deshidrogenasa, consiste de un dominio N terminal α/β dinucleotídico y un dominio C terminal α helicoidal, este último es responsable de la homodimerización, (la estructura de la enzima *Hinf*PDH, es la primera estructura bifuncional TyrA en ser determinada).

La conversión de pterfenato en p-hidroxifenilpiruvato, es llevada a cabo por el dominio TyrA_{Ec} de la proteína T, utilizando NAD⁺ como cofactor, presentando TyrA_{Ec} menor nivel de expresión y estabilidad cuando se expresa sin su fusión natural con el dominio de corismato mutasa AroQ_T [15].

En el laboratorio del Dr. Joel Osuna, se realizaron distintas fusiones en el extremo N-terminal del dominio TyrA_{Ec} de la proteína T de *E. coli*, a fin de comprobar el papel de la superficie de contacto entre AroQ_T y TyrA_{Ec}, en la función de la proteína T. Se encontró que el dominio β 1 de unión a inmunoglobulina de la proteína G (G β 1), es capaz de producir una proteína TyrA_{Ec} dimérica funcional (figura 19) [14].

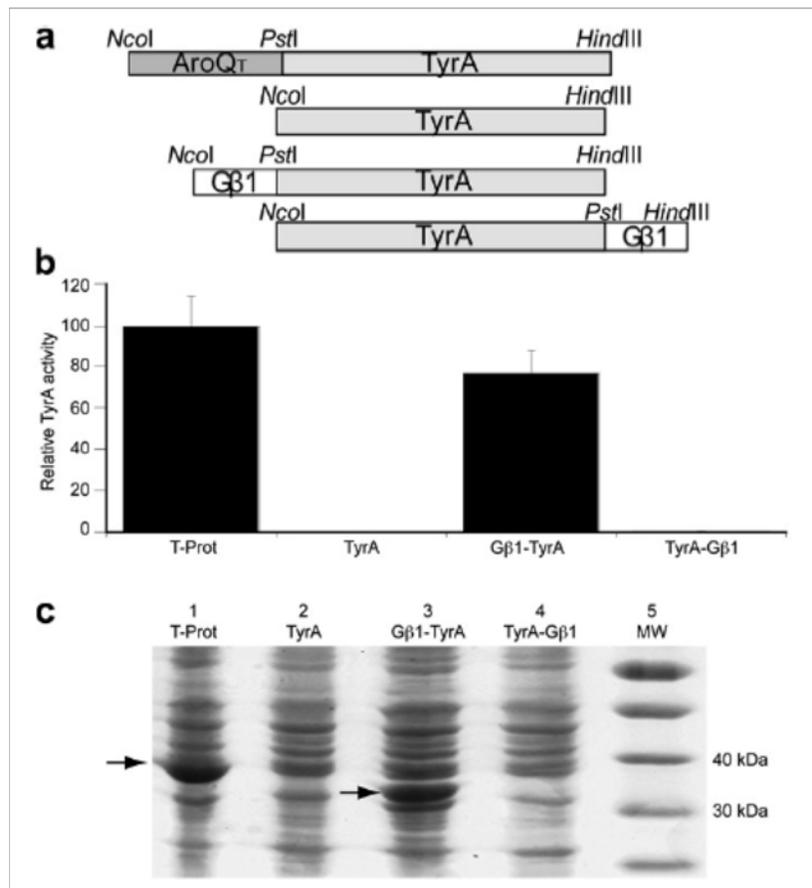


Figura 19. Actividades y niveles de expresión de pterfenato deshidrogenasa, en fusiones N y C terminal (14).

Como se muestra en la figura 20, se realizaron fusiones de la proteína G β 1, tanto al extremo C-terminal, como N-terminal de TyrA_{Ec}. Las actividades y nivel de

expresión, mostraron niveles excelentes en la fusión de G β 1 en el extremo N-terminal de PDH (TyrA_{EC}), mientras que la fusión en el extremo C-terminal, tuvo resultados negativos en actividad y nivel de expresión, al igual que en el caso de TyrA_{EC} clonada de manera independiente.

Por lo anterior, en este proyecto, **la fusión con VH_{1F7} se realizará en el extremo N-terminal de TyrA_{EC}.**

Posteriormente, se evaluó la actividad de pefenato deshidrogenasa, con fusiones (en su extremo N-terminal) de diferentes variantes de G β 1. Estas variantes de G β 1 se caracterizan por contener diversas mutaciones específicas, y todas las variantes forman dímeros de diferente estabilidad, a excepción de la variante "Tetra", la cual forma un tetrámero.

Todas las fusiones de TyrA_{EC} con variantes diméricas de G β 1, reestablecieron la actividad de PDH, en un rango del 20-100% de actividad relativa, a excepción de la variante tetramérica, la cual fue incapaz de reestablecer la actividad de PDH así como el nivel de expresión (figura 20).

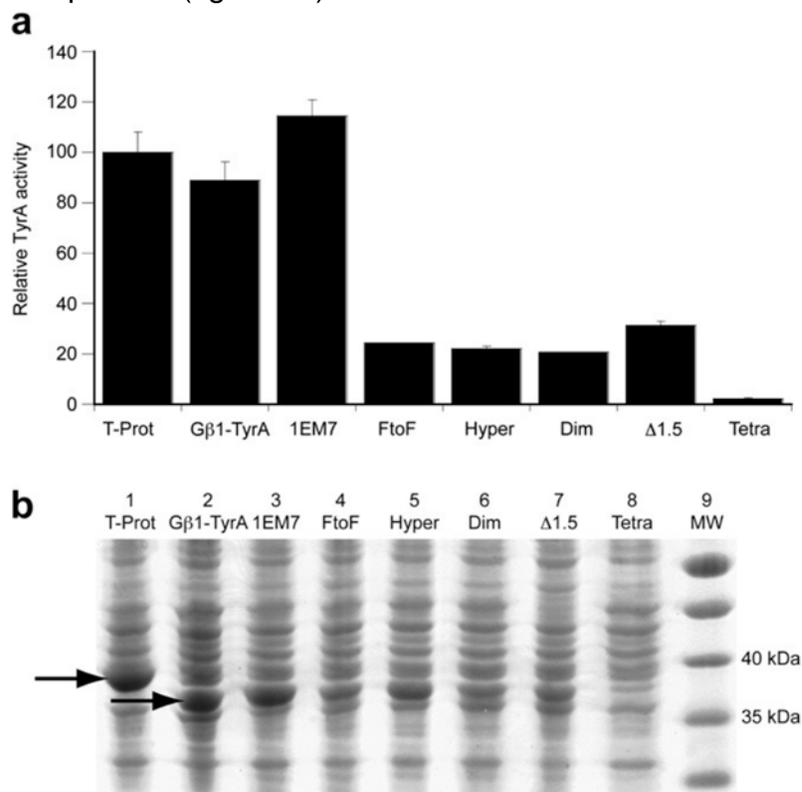


Figura 20. Actividades y niveles de expresión de pefenato deshidrogenasa, en fusiones con diferentes variantes de G β 1 (14).

De forma que se demuestra la viabilidad de la utilización de la enzima pefenato deshidrogenasa como reportero de dimerización. La estabilidad (y actividad) del homodímero de TyrA_{EC} (y los niveles de expresión de la proteína de fusión x-

TyrA_{Ec}) dependen de la formación de un homodímero de la proteína fusionada al extremo N-terminal de TyrA_{Ec}.

3.7 VECTOR DE EXPRESIÓN

El vector de expresión pTrc99A, ha sido desarrollado en orden de facilitar la sobreproducción regulada de diferentes proteínas en *E. coli* [44]. El genotipo del plásmido utilizado en este proyecto es el siguiente: **pTrc99A** (*trc* promoter/operator, *lacI*^Q, *Amp*^R, ColE1 replicon), (Amann et. al (1988)). La figura 21 muestra las regiones de control de estos plásmidos:

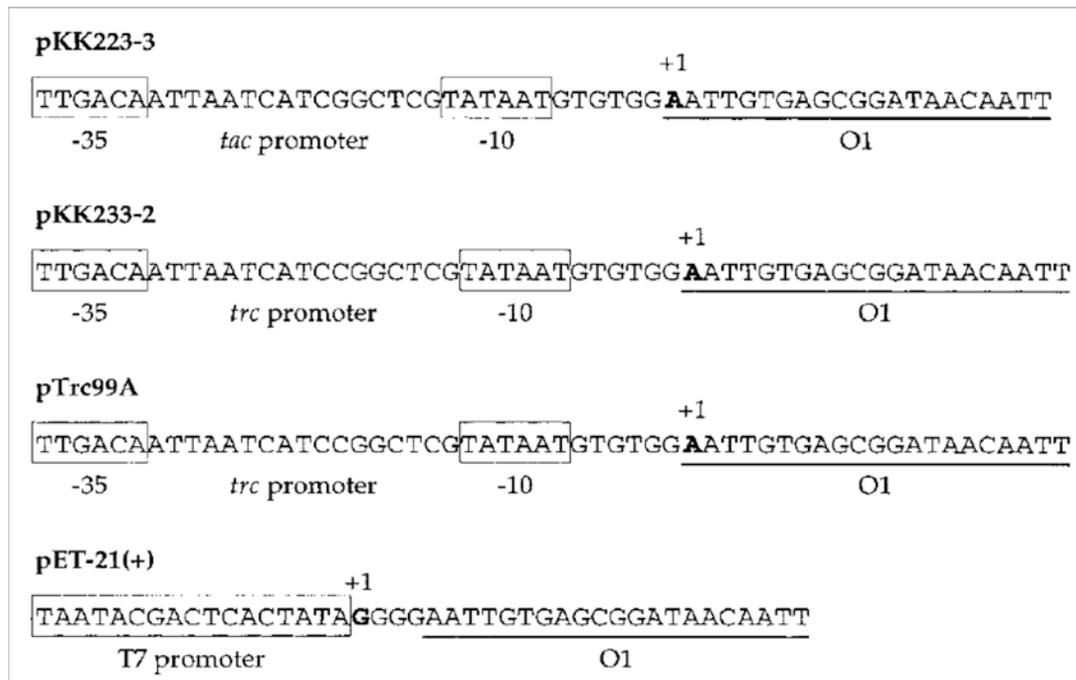
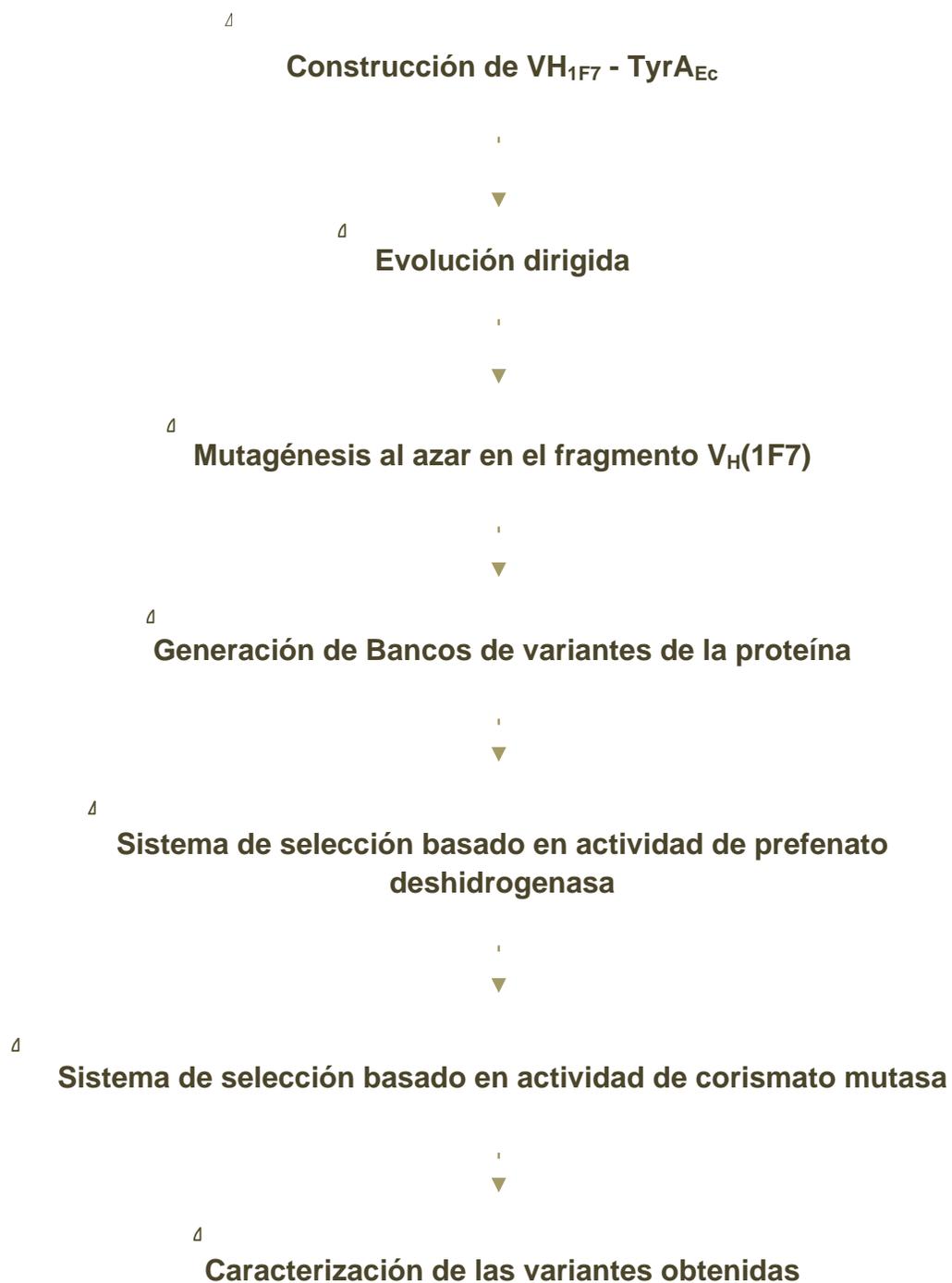


Figura 21. Regiones de control empleadas en vectores de expresión.

CAPÍTULO 4. MARCO METODOLÓGICO

4.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



4.2 MÉTODOS

4.2.1. ARMADO DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN VH_{1F7} - PDH

- **Diseño de oligonucleótidos *forward* y *reverse*, para amplificación del fragmento de VH**

Los oligonucleótidos *forward* y *reverse* se diseñaron en base a la secuencia N y C terminal del fragmento de ADN codificante para el fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7. Se adicionaron los sitios de restricción *NcoI* (oligonucleótido *forward*) y *PstI* (oligonucleótido *reverse*), además de incluir una secuencia de bases que codifica para un conector de cuatro glicinas y una serina para mejorar la interacción entre el fragmento VH (1F7) y el dominio PDH. Se adicionó además una secuencia aleatoria de 6 pares de bases, entre el sitio de restricción y el extremo 5' del primer, para asegurar una unión adecuada entre la enzima de restricción y el ADN.

- **Protocolo de Purificación del producto de la PCR**

El protocolo de purificación mencionado a continuación, está basado en la metodología del manual *High Pure PCR Product Purification Kit* de Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA.

- **Proceso de digestión enzimática**

En el proceso de digestión enzimática se utilizan los siguientes reactivos: ADN blanco (por ej. Producto de la PCR a digerir), enzimas de restricción, buffer para la reacción de digestión específica, BSA (para algunas reacciones de digestión) y agua bidestilada.

Fueron utilizadas enzimas de restricción de New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Las enzimas utilizadas en este proyecto fueron: *NcoI*, *PstI*, *HindIII*. Su concentración varía entre 10,000 - 50,000 unidades/ml.

- **Protocolo de limpieza de digestiones**

El protocolo de limpieza de digestión mencionado, está basado en la metodología indicada en el manual de *Agarose Gel DNA Extraction Kit*, de Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA.

- **Proceso de ligación enzimática**

En el proceso de ligación enzimática, se utiliza la enzima T4 DNA ligasa de New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Esta reacción necesita de los siguientes reactivos: DNA a insertar (limpio), vector digerido con los sitios de restricción

deseados (limpio), enzima T4 DNA ligasa, Buffer de ligación, agua bidestilada (de ser requerida).

- **Protocolo de concentración con butanol**

Este protocolo se utiliza para concentrar y limpiar ligaciones antes de someterlas a un proceso de electroporación, donde los componentes de la reacción de ligación pueden originar un arco eléctrico en el proceso de electroporación, originando la destrucción de las células electrocompetentes utilizadas.

- **Transformación por electroporación**

En este proceso de transformación se utilizan células electrocompetentes *E. coli* MC1061, las cuales son utilizadas como hospedero en todas las construcciones y elaboración de bibliotecas de variantes.

- **Sembrado de células en cajas de medio LB con antibióticos**

Una vez recuperadas las células transformadas, se procede a sembrarlas en medio LB sólido, con los antibióticos necesarios, para asegurar el crecimiento de las células electrocompetentes transformadas con el plásmido deseado. En el caso de este proyecto de investigación, el plásmido pTrc99A (utilizado como vector de expresión), contiene resistencia al antibiótico ampicilina, de manera que al transformar con las células MC1061, se utilizan cajas de medio LB con ampicilina.

4.2.2 CICLOS DE EVOLUCIÓN DIRIGIDA

Mutagénesis

- **PCR mutagénica *Diversify***

El protocolo de PCR mutagénica descrito a continuación, está basado en el manual de usuario de *Diversify (R)*, *PCR Random Mutagenesis Kit*, de Clontech Laboratories, Inc. El procedimiento se basa en el desarrollo de una reacción de PCR, bajo condiciones que reduzcan la fidelidad en la incorporación de nucleótidos. Para esto, se utiliza sulfato de manganeso ($MnSO_4$) y una concentración distinta de dGTP. La tasa de mutaciones al azar, se lleva a cabo mediante la variación independiente de $MnSO_4$ y dGTP, en la reacción de PCR. Las cantidades de reactivos a utilizar, respecto al nivel de mutagénesis deseado, se muestra en el cuadro 4:

TABLE III: MUTAGENESIS REACTIONS										
Mutations per 1,000 bp	Volumes by Buffer Condition (µl)									Std. ^a
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PCR Grade Water	40	39	38	37	36	35	34	33	32	41
10X TITANIUM <i>Taq</i> Buffer	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
MnSO ₄ (8 mM)	0	1	2	3	4	4	4	4	4	0
dGTP (2 mM)	1	1	1	1	1	2	3	4	5	0
50X Diversify dNTP Mix	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
50X dNTP Mix	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Primer mix ^b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Template DNA ^c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TITANIUM <i>Taq</i> Polym.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total volume	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Cuadro 4. Cantidades de reacción respecto al nivel de mutagénesis. *Diversify (R) PCR Random Mutagenesis Kit, User Manual. Clontech Laboratories, Inc.*

En este proyecto se utilizó un nivel de mutagénesis de 9 mutaciones por cada 1,000 pb. Se realizó la reacción de manera convencional, cuidando de mezclar todos los componentes previamente a la aplicación de la enzima TITANIUM *Taq* Polimerasa, y mezclando ligeramente después de la aplicación de la misma.

Una vez concluido el proceso de la PCR mutagénica, se preparó una electroforesis para corroborar el resultado de la PCR. Se procedió con el lavado, y procedimientos de clonación, como son: digestión con enzimas de restricción, (limpieza de digestión), ligación en vector de expresión, (limpieza), electroporación de la cepa de *E. coli* MC1061, siembra en cajas de LB-agar-antibióticos, inóculos en LB-antibióticos, purificación de plásmido, y secuenciación.

- **Proceso de Shuffling**

El proceso de Shuffling utilizado, se basó en el protocolo indicado por Ira Pastan y Lorimer, A.J. Ian, [46]. El procedimiento de DNA Shuffling, consiste en dos pasos principales: la fragmentación del DNA blanco, con enzima DNAsal, y el reensamblado de los fragmentos de DNA, mediante PCR.

El procedimiento descrito por Ira Pastan, introduce Mn²⁺ en el proceso de digestión con DNAsal, lo cual introduce cortes (de doble cadena) al azar, sobre el ADN blanco, produciendo grupos de fragmentos pequeños (menores a 50 pb), que pueden ser utilizados para reensamblar de manera más eficiente el gen, sin necesidad de ser purificados mediante gel de agarosa (este procedimiento de purificación era necesario en la metodología propuesta por Willem P.C. Stemmer [49]).

Para llevar a cabo el reensamblado con los fragmentos, se utilizan 20 µL de digestión (limpias mediante el protocolo de *DNA Extraction from agarose gels*, de

QIAGEN, para purificación de fragmentos de DNA menores a 100pb). Este volumen de digestión limpio, se incorpora en una reacción de PCR, en la cual se utilizan los fragmentos de digestión, como DNA templado y como primers, para reensamblar el gen en su tamaño original.

Se procede al aislamiento del gen reensamblado, mediante una reacción de PCR, en la cual se emplea el producto de PCR anterior, como ADN blanco de la reacción. Se utiliza 1 μ L de PCR (ensamblado) como blanco, además de los primers *forward* y *reverse*, correspondientes para dicho gen.

Generación de banco de variantes

- **Transformación por electroporación**

El proceso de transformación por electroporación, se llevó a cabo de acuerdo al protocolo indicado anteriormente.

Para la generación del banco de variantes, la recuperación celular se realiza preferentemente en **Medio SOC** (Extracto de levadura (5 g), Triptona (20 g), NaCl (0.5g), KCl (0.186 g), MgSO₄ (2.408 g), Glucosa (3.6 g). Se ajusta el pH a 7.0, con NaOH. Aforar a 1 Lt con agua destilada), durante 1 hora. Posteriormente se siembran las células en placas LB- agar, con antibióticos. Es necesario contar el número de colonias que son capaces de crecer, a partir de 1 μ L de medio de cultivo. El tamaño del banco será expresado el número de colonias (variantes)/ml.

Selección

- **Medio de complementación**

Los componentes para la preparación del Medio de Complementación, son los siguientes:

- Sales M9 (10x)
- Glucosa (20 %)
- Sulfato de Magnesio, MgSO₄ (1 M)
- Cloruro de Calcio, CaCl₂ (0.1 M)
- Tiamina-HCl (5 mg/ml)
- Aro-Mix (1000x)
- L-triptófano (10 mg/ml)
- L-fenilalanina (10 mg/ml)
- L-leucina-isoleucina (10 mg/ml)
- Ampicilina (100 mg/ml)
- Kanamicina (25 mg/ml)
- Cloranfenicol (40 mg/ml)

Se mezclan todos los componentes, y se afora con agua bidestilada al volumen deseado (de manera estéril).

NOTA:

❖ **Sales M9 10x:**

El método de preparación es el siguiente:

1. Para 1Lt de sales M9 10x, se adicionan:
 - Na_2HPO_4 : 60 g
 - KH_2PO_4 : 30 g
 - NH_4Cl : 10 g
 - NaCl : 5 g
2. Se ajusta el pH a 7.0, utilizando NaOH 5 M.
3. Se afora el volumen a 1Lt, con agua destilada.

❖ **Aro-Mix 1000x**

El método de preparación es el siguiente:

1. Para 20ml de Aro-Mix 1000x, se adicionan:
 - Ácido-4-hidroxibenzóico: 100 mg
 - Ácido 4-aminobenzóico: 100 mg
 - Ácido 2,3-dihidroxibenzóico: 31 mg
2. Estos reactivos se disuelven en un tubo Falcon, con agua destilada.
3. Se ajusta el pH a 5-7, utilizando NaOH 5 M.
4. Se afora al volumen (20 ml), con agua destilada.
5. Se esteriliza por filtración.
6. Se almacena a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

• **Crecimiento en medio de complementación**

Para el crecimiento en medio de complementación, se preparan inóculos en el volumen de medio de complementación deseado para el crecimiento. Pueden prepararse inóculos desde $150\text{ }\mu\text{L}$, para crecimiento en placas de 96 pozos, hasta inóculos de 15-20 ml, para su crecimiento en incubadora a $30\text{ }^\circ\text{C}$, con agitación.

4.2.3 ENSAYOS DE EXPRESIÓN

Proceso de expresión de proteína

• **Transformación de la cepa de selección por electroporación**

El procedimiento de transformación por electroporación, es el mismo al descrito anteriormente.

La cepa de selección utilizada, es la cepa de *E. coli* FA114 (cepa FA113, con delección de los segmentos de ADN codificantes para las proteínas T y P). Esta cepa fue seleccionada para sobre-expresar las diferentes construcciones de proteínas de fusión, así como para preparar los extractos bacterianos utilizados en los ensayos enzimáticos de TyrA.

- **Expresión**

Para los procedimientos de crecimiento y expresión (sobre-expresión de proteína), se prepararon inóculos de 15ml de medio LB más los antibióticos necesarios. Estos inóculos, de células *E. coli* FA114, conteniendo el gen *tyrA* o las variantes de *tyrA* (construcciones de proteínas de fusión), fueron puestos a crecer a 30 °C, con agitación (300 rpm).

Una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6 (OD) a 600 nm, se adicionó IPTG (0.1mM, concentración final), y los cultivos fueron incubados a 30°C, con agitación, por 12 hrs.

Los cultivos fueron centrifugados durante 15 minutos, a 4,500 rpm.

- **Medición de actividad de pefenato deshidrogenasa**

Para los procesos de medición de actividad de pefenato deshidrogenasa, puede utilizarse el extracto soluble (sobrenadante después de la centrifugación), producto del proceso de sonicación.

El proceso se describe a continuación:

1. En una placa de 96 pozos, se adicionan 115 μ L de **Buffer de actividad** (50 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA sódico, 0.1 mg/ml BSA (bovine serum albumin)), 15 μ L de DTT (1 mM) y 5 μ L de NAD⁺ (2 mM). Se mezclan estos componentes, procurando no formar burbujas.
2. Se prepara el protocolo del lector de placas Safire, el cual es controlado por una plataforma Tecan (Tecan Group LTD, Männedorf, Switzerland). Las lecturas se realizarán a 340 nm, midiendo la producción de NADH.
3. Una vez preparado el protocolo Tecan, se procede a iniciar la reacción. Se añaden primeramente de 1-5 μ L de extracto soluble (o bien 0.2 μ g de proteína pura), y a continuación (de la manera más rápida posible) se adicionan 10 μ L del sustrato, pefenato (a una concentración final aproximada, de 2mM).

4. Se inician los ciclos de medición de actividad. Los gráficos de actividad generados, pueden guardarse y analizarse posteriormente.

4.2.4 ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN DE ACTIVIDAD DE PDH Y CM DE LAS VARIANTES SELECCIONADAS

Complementación en medio sólido

- **Preparación de medio de complementación sólido**

La adición de los antibióticos es dependiente de la cepa de *E. coli* a utilizar. En el caso de la cepa de selección FA114, ésta es resistente a kanamicina (Km), mientras que el vector de expresión pTrc99A es resistente a ampicilina (Amp). Por otro lado, el plásmido accesorio pACYC, utilizado para adicionar actividad de corismato mutasa, contiene resistencia a cloranfenicol (Cm). De manera que, al utilizar la cepa de selección sin actividad de corismato mutasa, se emplean sólo los antibióticos: ampicilina y kanamicina, mientras que al utilizar la cepa de selección más el plásmido accesorio pACYC, se emplean los antibióticos: ampicilina, kanamicina y cloranfenicol.

4.2.5 CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES SELECCIONADAS

Mediciones de fluorescencia con GFP

- **Clonación con GFP**

Se clonó el gen de la GFP entre los sitios de restricción *PstI* y *HindIII*, en el vector de expresión pTrc99A.

En pTrc99A, las variantes de VH(1F7), se localizan entre los sitios de restricción *NcoI-PstI*, mientras que el gen codificante para la enzima pefenato deshidrogenasa (PDH) de *tyrA*, se localiza entre los sitios de restricción *PstI-HindIII*.

Se realizó una digestión con *PstI-HindIII*, en pTrc99A. Al gen codificante para la proteína GFP, se le introdujeron, mediante PCR (con primers *forward* y *reverse*, diseñados), los sitios de restricción *PstI* y *HindIII*. Se realizó una digestión *PstI-HindIII*, del producto de la PCR de GFP.

Una vez limpiadas ambas digestiones, se procedió con la ligación, entre el vector pTrc99A y GFP.

El producto de ligación se transformó a la cepa de *E. coli* MC1061. Se purificó plásmido, para cada una de las variantes VH(1F7), (ligadas a GFP), y se mandó secuenciar. Ya una vez corroboradas las construcciones VH(1F7)-GFP, se procedió con la medición de intensidad de fluorescencia.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1 Armado de la proteína de fusión VH_{1F7} - PDH

Se llevó a cabo la clonación del fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7 en el vector pTrc99A, el cual contiene el gen que codifica para la enzima prefenato deshidrogenasa (TyrA), localizada entre los sitios de restricción *Nco*I - *Hind* III.

El proceso de clonación constó de las etapas principales:

- Digestión con las enzimas de restricción *Nco*I - *Pst*I.
- Ligación del fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7, en los sitios de restricción. (Ver Métodos)

En el proceso de clonación, se incluyó un linker de 15 pares de bases, compuesto de 4 residuos de Gly y un residuo de Ser, para mejorar el contacto entre el fragmento VH_{1F7} y el hapteno.

La figura 22 ilustra la construcción en el vector pTrc99A, llevada a cabo:

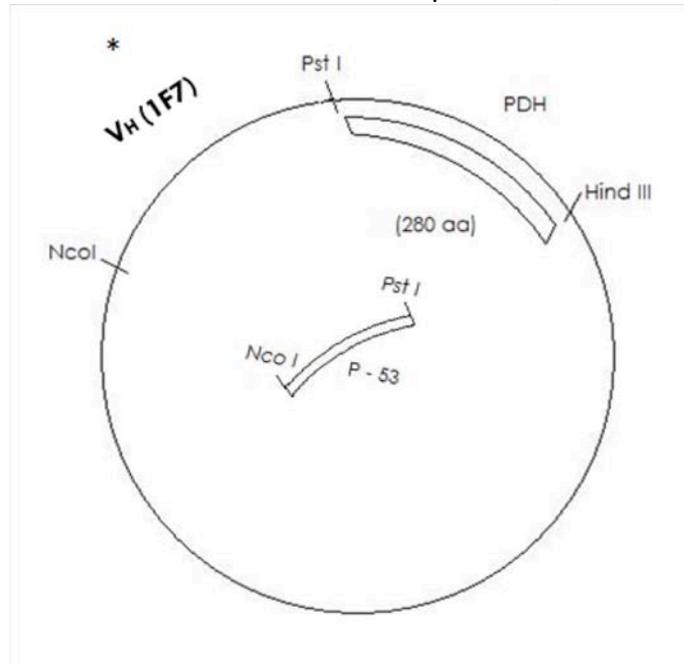


Figura 22. Construcción del plásmido pTrc99A que porta las regiones de DNA codificantes para VH_{1F7} - TyrA_{Ec}.

Se seleccionó la clona 5VH link, ya que la secuencia mostró que no portaba mutaciones adicionales.

5.2 Primer ciclo de evolución dirigida

Mutagénesis en el fragmento VH_{1F7}

Posteriormente se procedió a mutagenizar al azar el fragmento que codifica para VH1F7, utilizando el protocolo de PCR mutagénica *Diversify*, utilizando una tasa de mutagénesis de 9 mutaciones por cada 1000 pares de bases (Ver Métodos), llevando a cabo la clonación posterior del fragmento VH_{1F7} mutagenizado, en el vector pTrc99A.

Generación del banco de variantes

El producto de la ligación se transformó en la cepa MC1061 de *E. coli*, obteniéndose un banco de 40,000 colonias/ml, al que se le denominó Banco I.

Proceso de selección

Para continuar con el proceso de evolución dirigida, se realizó la selección de variantes en base a la actividad de pefenato deshidrogenasa. La figura 23 esquematiza el proceso realizado.

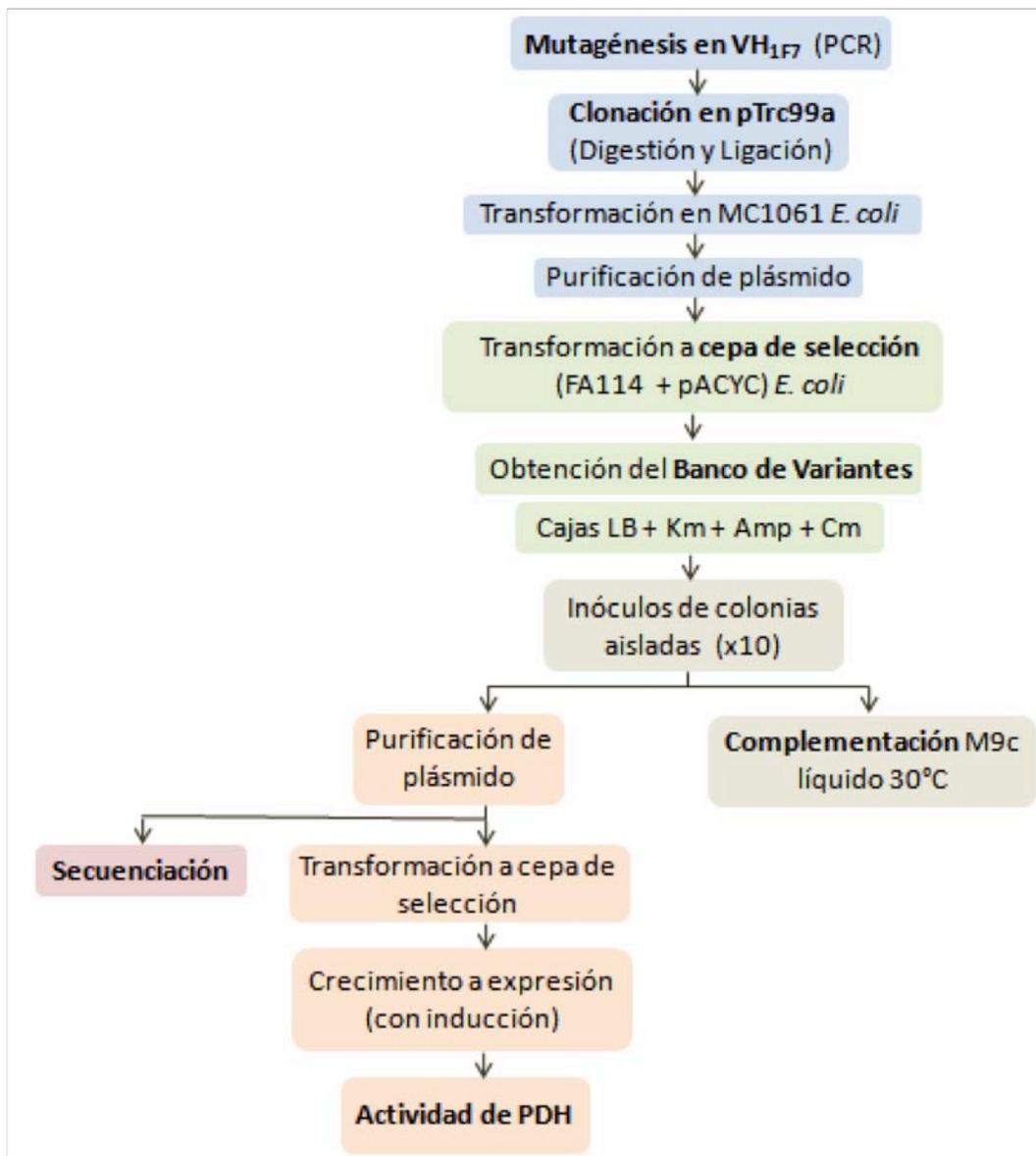


Figura 23. Esquema del proceso de selección, para actividad de pefenato

Para esta selección, se utilizó la cepa FA114 ($\Delta pheA \Delta tyrA$ Km^r, Cm^r) + CM $pheA$ ($pheA_{CM}$), con el plásmido pACYC, conteniendo así el gen codificante para la enzima corismato mutasa, (CM $pheA$, que participa en la ruta biosintética de fenilalanina en *E. coli*), de manera que la presión selectiva estuviera dirigida a seleccionar solamente la actividad de pefenato deshidrogenasa (TyrA_{Ec}). (Ver Marco Teórico pág. 11, figura 4).

Para el proceso de selección se eligieron 10 colonias independientes (al azar) del banco, las cuales fueron puestas a crecer en 20ml de medio de complementación sin tirosina, se incubaron a 30°C y se observó crecimiento durante 2 días.

Se llevó a cabo la expresión de proteína de las diez variantes elegidas, para realizar mediciones de actividad de pefenato deshidrogenasa. Los resultados de actividad relativa se muestran en la figura 24:

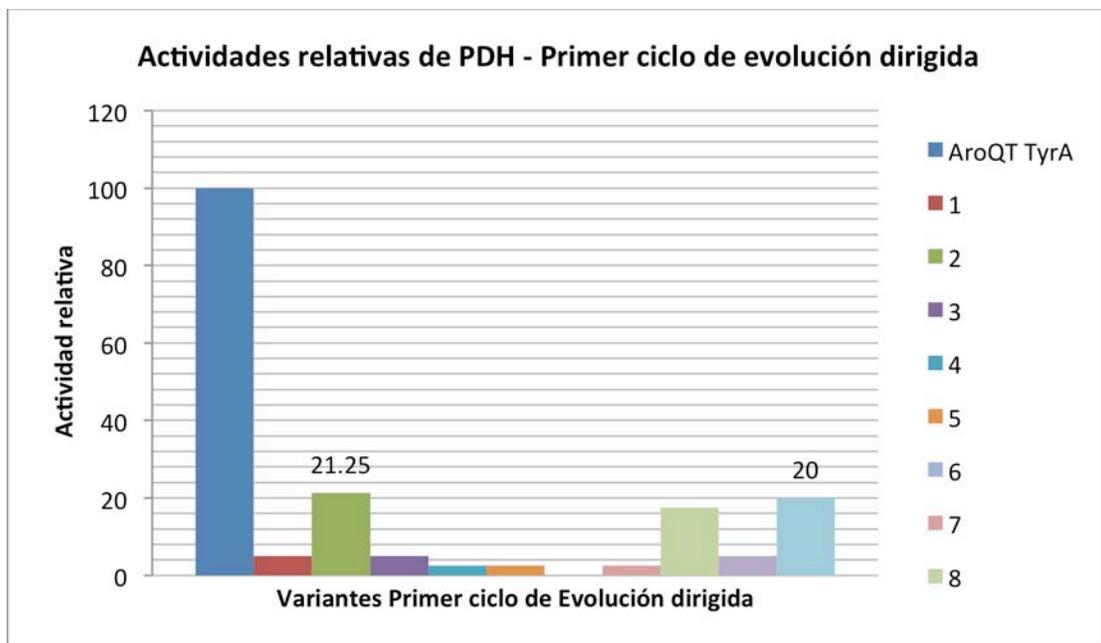


Figura 24. Actividades relativas de PDH. Variantes analizadas en el primer ciclo de evolución dirigida.

Como se puede observar, las mejoras en actividad no son muy evidentes, excepto para las variantes 2 y 10. La variante 8 no fue elegida debido a resultados en secuencia. Esta secuencia presentó deleciones en fragmentos de la secuencia del gene de VH_{1F7}.

Posteriormente se mandó secuenciar a las variantes seleccionadas, para ver qué mutaciones fueron las responsables de estos cambio en actividad de PDH. En el cuadro 5 se muestran los resultados de dicha secuenciación:

Clona	Pendiente (m)	Mutaciones
2	1E-04	H83R, C97R
10	9E-05	V19A, Y109D

Cuadro 5. Mutaciones presentes en 2 clonas seleccionadas. Se muestra también la pendiente de la curva de actividad obtenida.

En resumen, en el primer ciclo de evolución dirigida, en base a resultados de actividad y secuencia, fueron elegidas las variantes denominadas 2 y 10, para continuar con el proceso de evolución.

5.3 Segundo ciclo de evolución dirigida

Se obtuvieron bancos de las clonas seleccionadas (2 y 10), en el primer ciclo.

El procedimiento para la realización de los bancos sin selección fue el mismo que el mencionado anteriormente, su tamaño se menciona a continuación:

Banco 2: 116,000 col/ml (referente al banco generado a partir de la variante 2).

Banco 10: 44,000 variantes (col/ml) (referente al banco generado a partir de la variante 10).

A partir de ellos se seleccionaron 10 clonas, de la misma manera que en el primer ciclo de evolución, aplicando el proceso de selección también mencionado, que se basa en el crecimiento en medio de complementación durante 2 días, y la medición de las actividades de pefenato deshidrogenasa.

Los resultados de la actividad relativa en este segundo proceso de selección, correspondientes al Banco 2, se muestran en la figura 25.

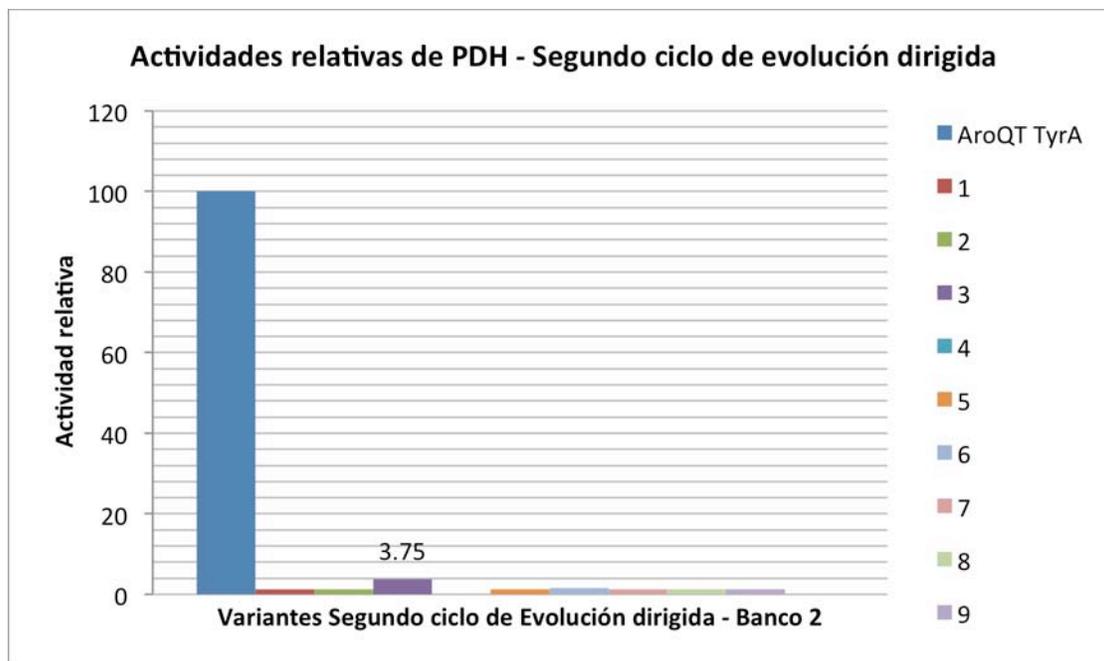


Figura 25. Actividades relativas de PDH. Variantes analizadas en el segundo ciclo de evolución dirigida. Banco 2.

En este caso las actividades relativas no mostraron porcentajes mayores al 4%, en comparación a los porcentajes de 21 y 20%, obtenidos en la selección del primer ciclo de evolución. La variante 3 (mencionada posteriormente como variante 3(2)), se seleccionó para continuar con el siguiente ciclo de evolución.

Respecto al Banco 10 de este segundo ciclo de evolución, se aplicó igualmente el proceso de selección para 10 colonias. Los resultados de actividad relativa se muestran en la figura 26.

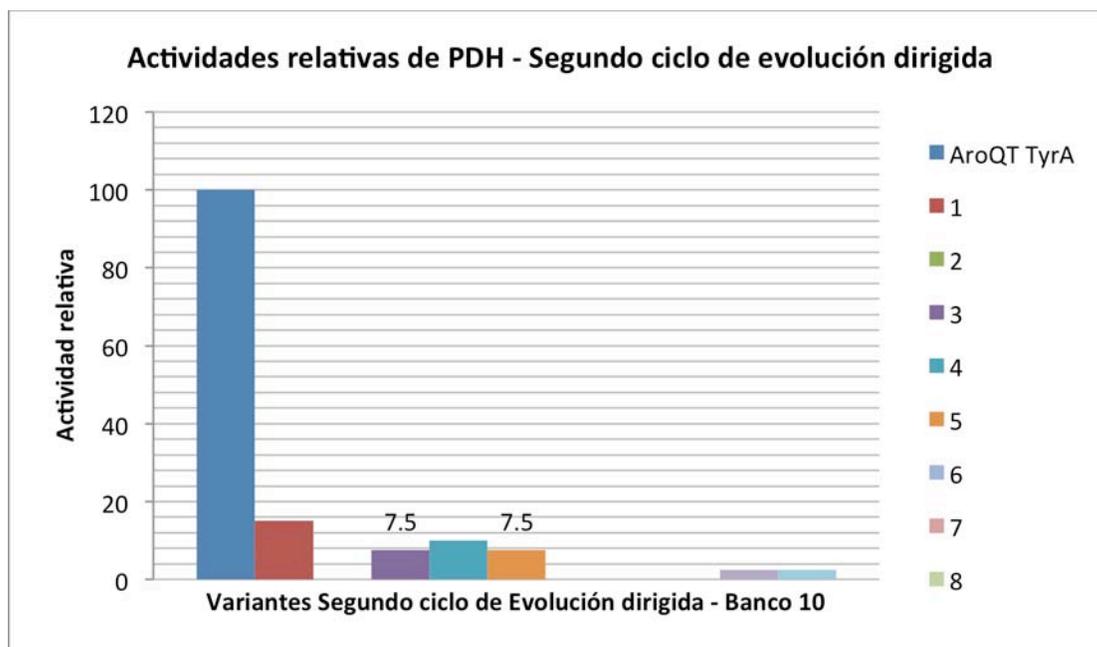


Figura 26. Actividades relativas de PDH. Variantes analizadas en el segundo ciclo de evolución dirigida. Banco 10.

En este caso la mayor actividad observada es del 7.5%. Las variantes 3 y 5 mencionadas como 3(10) y 5(10), fueron seleccionadas para continuar con el siguiente ciclo de evolución. Si bien las variantes 1 y 4 muestran un mayor nivel de actividad de pfenato deshidrogenasa, éstas fueron descartadas debido a los resultados observados en su secuencia (deleciones en fragmentos de secuencia de VH_{1F7}). Las mutaciones presentes en las clonas seleccionadas en el segundo ciclo de evolución dirigida se muestran en el cuadro 6:

Clona	Mutaciones
Banco 2	L71S, H83R, L84P, C97R
3	
Banco 10	
3	V19A, Y109D
5	Y109D

Cuadro 6. Mutaciones presentes en variantes seleccionadas del segundo ciclo de evolución dirigida.

En resumen, en el segundo ciclo de evolución, se generaron bancos de variantes individuales (2 y 10), seleccionando a las variantes 3(2), 3(10) y 5(10).

Para obtener una mejor selección de variantes, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio de complementación, en placas de 96 pozos, incrementando así el número de variantes a evaluar, de 10 a 96 variantes. Se utilizaron crecimientos previos en medio LB con los antibióticos Km, Cm y Amp, a partir de colonias aisladas. Una vez obtenidas las placas en medio LB, se realizaron inóculos de 1.5 μ L en 150 μ L de medio de complementación. Las mediciones fueron realizadas en el programa Tecan, a 600nm, por un tiempo de: 1día, 1hr, 34min, 45seg.

Las cinéticas obtenidas se muestran en las figuras 27, 28 y 29. En estos gráficos se muestran únicamente las curvas obtenidas para algunas variantes que representan el total de las curvas de crecimiento, esto debido a la imposibilidad de observar las variantes individuales en los gráficos que contienen las 96 variantes (Ver Anexos).

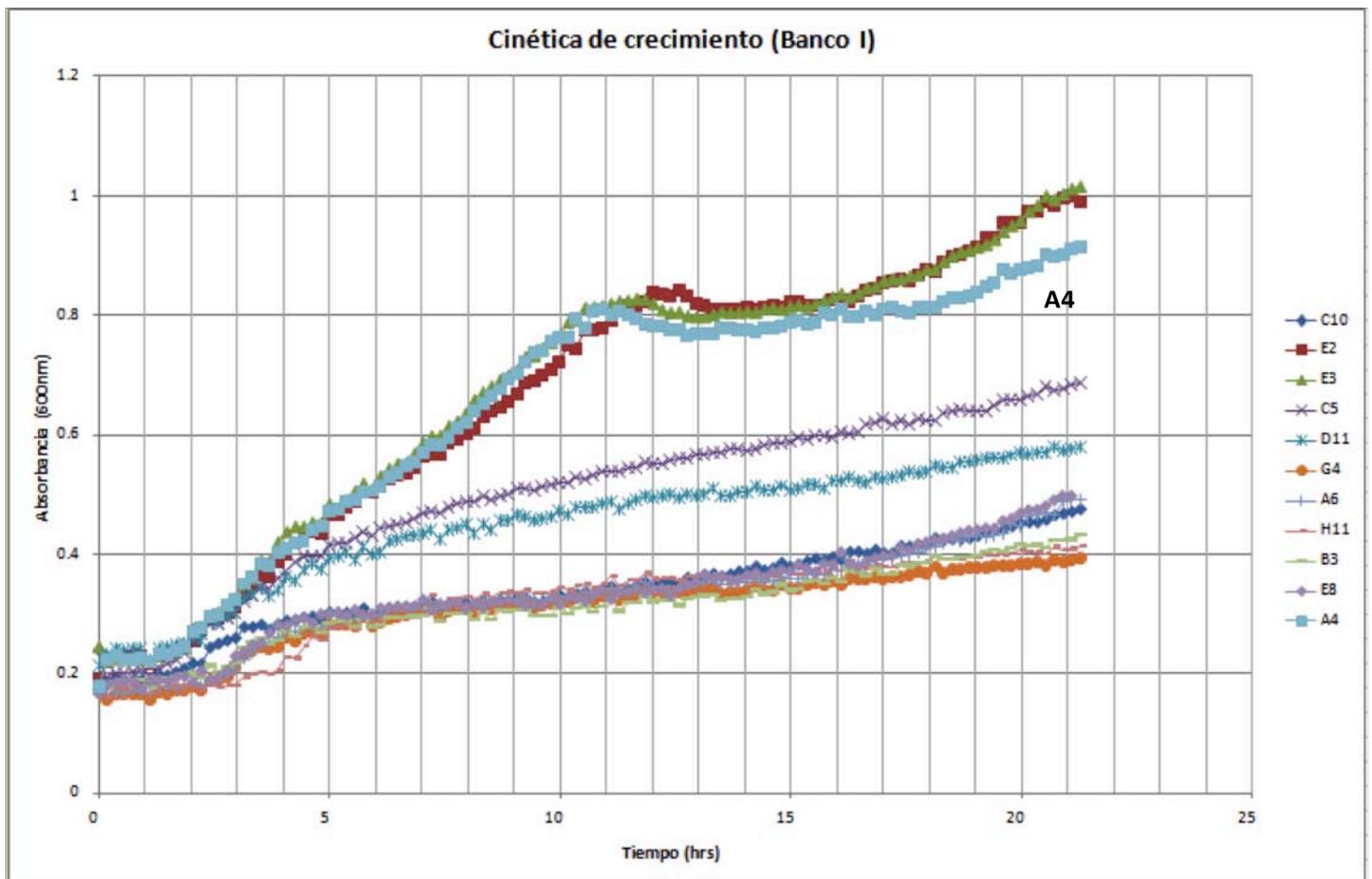


Figura 27. Cinética de crecimiento en medio de complementación del Banco I. Cepa FA114 + pACYC, a 30°C, por 24hrs, en placas de 96 pozos. (30°C)

La variante denominada A4 (debido a la localización del pozo), fue la seleccionada para continuar con los procesos de selección.

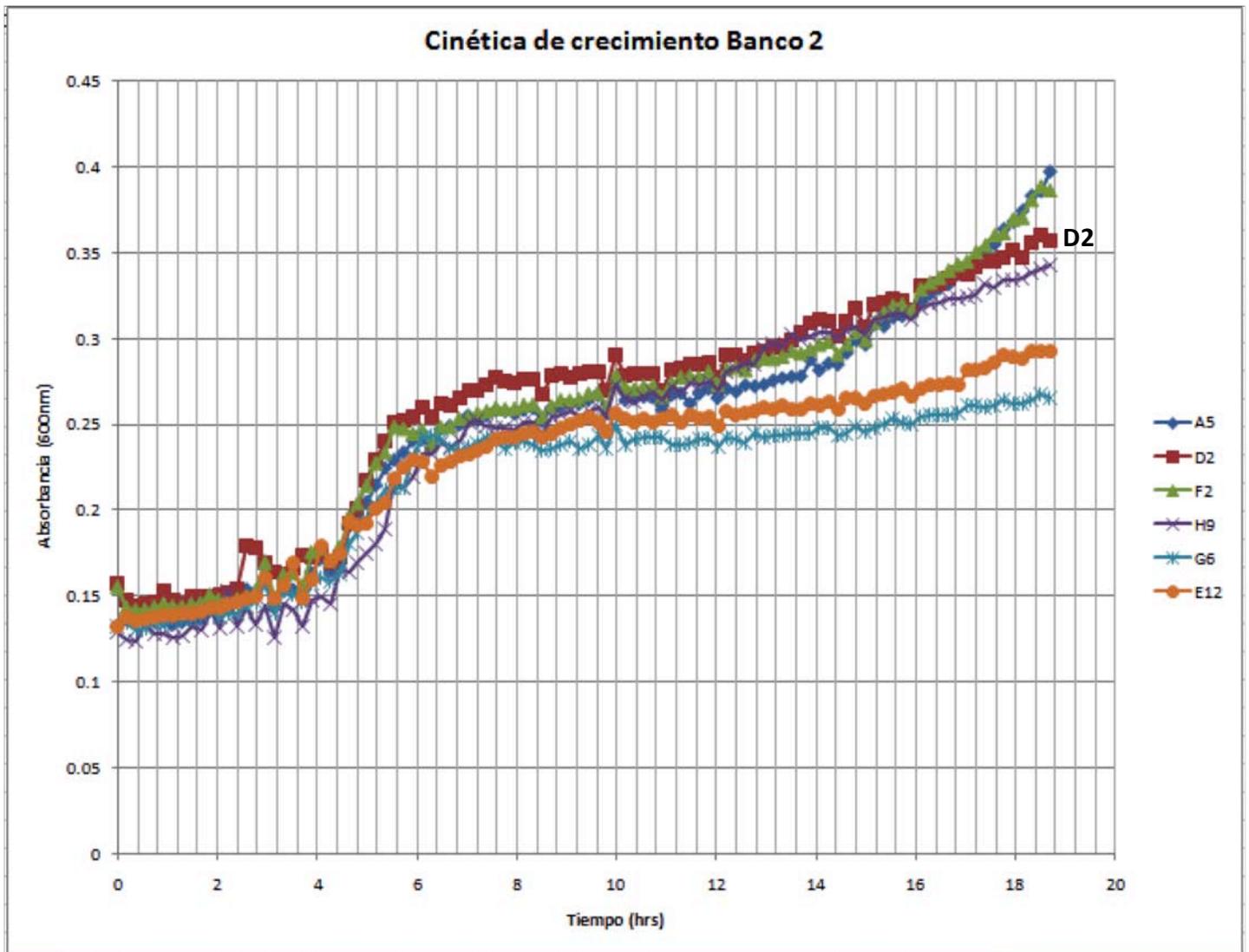


Figura 28. Cinética de crecimiento en medio de complementación, Banco 2.

En la cinética de crecimiento del Banco 2, las variantes A5, C3, D2, E11, F2, F3, F4, G4 y H9 presentaron mejor crecimiento en medio de complementación, sin embargo de acuerdo a su secuencia (deleciones en secuencia de VH_{1F7}), se eligió a la variante D2 para continuar con el siguiente ciclo de evolución dirigida.

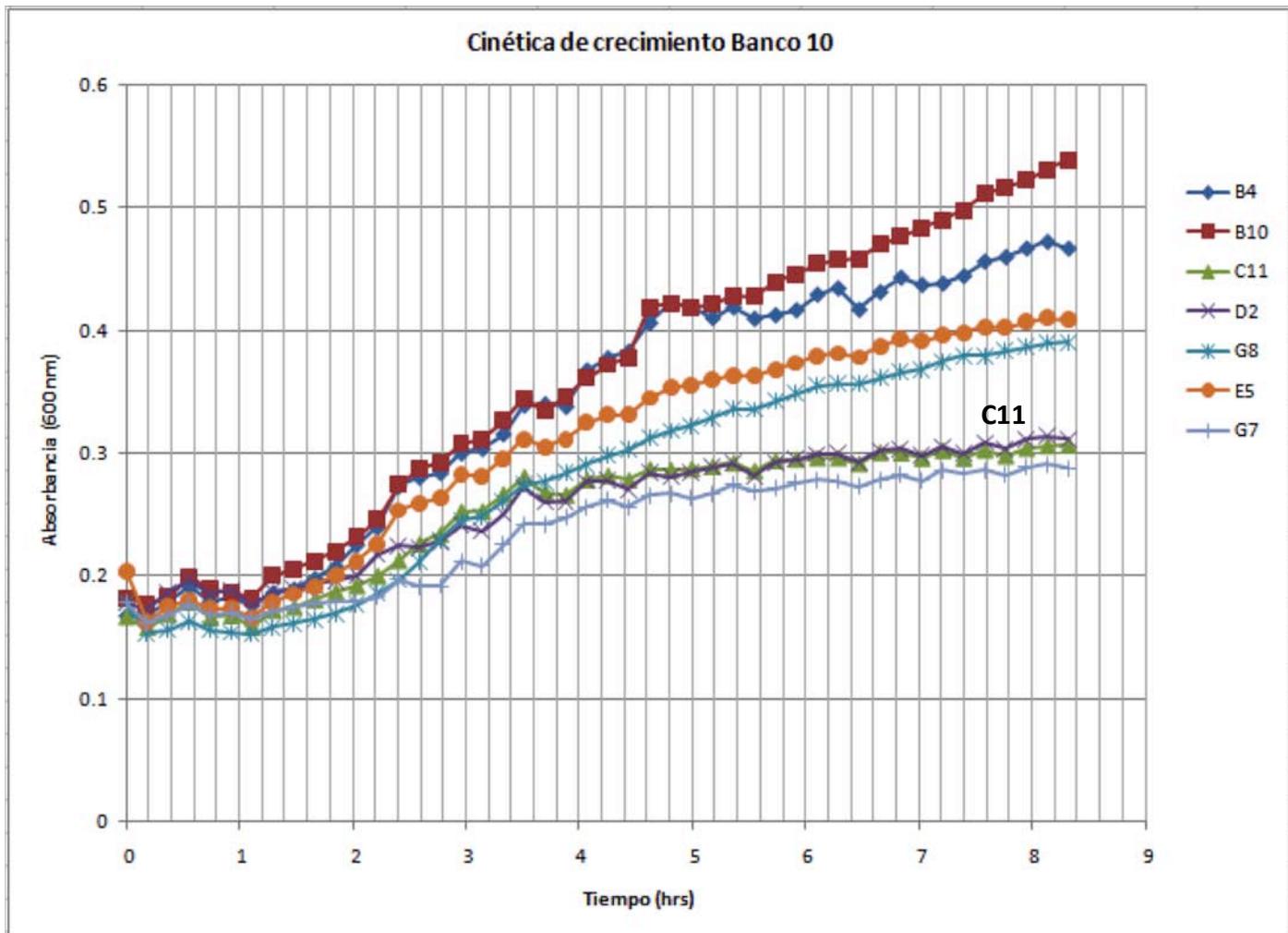


Figura 29. Cinética de crecimiento en medio de complementación, Banco 10.

En la cinética del Banco 10, las variantes que presentaron mejor crecimiento en medio de complementación fueron las denominadas: B4, B10, C11, D4, D7, E6, G4, H10 Y H11, sin embargo, de acuerdo a resultados de secuencia (deleciones en secuencia de VH_{1F7}), se eligió a la variante C11 para continuar con los ciclos de evolución dirigida.

Posteriormente fueron realizadas mediciones de actividad de prefenato deshidrogenasa, para las variantes A4, D2 y C11.

Los gráficos de actividad relativa se muestran en la figura 30:

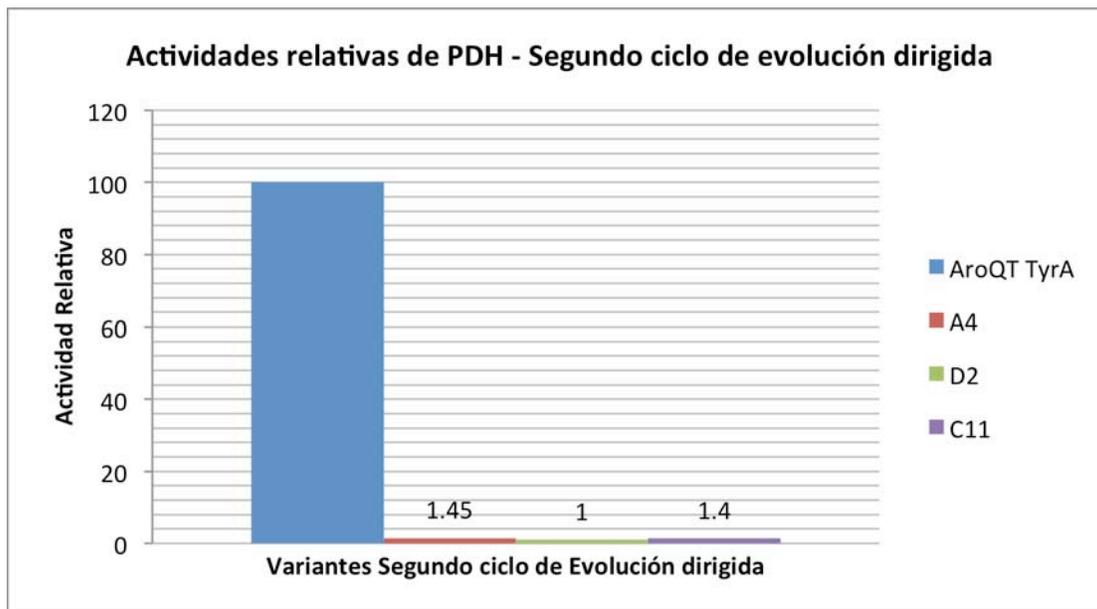


Figura 30. Actividades relativas de las variantes A4, D2 y C11 del segundo ciclo de evolución dirigida.

Como es mostrado en la figura 47, las actividades de pefenato deshidrogenasa para las variantes A4, D2 y C11, son menores al 1.5%, en comparación de los niveles de 7.5% obtenidos en el proceso de selección basado en actividad de pefenato deshidrogenasa anterior, y de los niveles de 20% obtenidos en el caso del primer ciclo de evolución dirigida.

Los cambios de las variantes A4, D2 y C11, se muestran en el cuadro 7:

Clona	Mutaciones
A4 -Banco 1	K20R
C11 -Banco 10	V19A, Y109D
D2 -Banco 2	W37R, N42D, K75E, H83R, C97R

Cuadro 7. Mutaciones ocurridas en las variantes A4, D2 y C11, del segundo ciclo de evolución dirigida.

De manera que hasta el momento, las variantes de VH seleccionadas son: 2, 10, 3(2), 3(10), 5(10), A4, D2 y C11.

En la figura 31, se muestra la localización de las mutaciones en las variantes A4, D2 y C11, mostrándose sólo el fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7. Las imágenes están basadas en la cristalografía del anticuerpo 1F7, identificada como el archivo 1FIG, de Protein Data Bank.

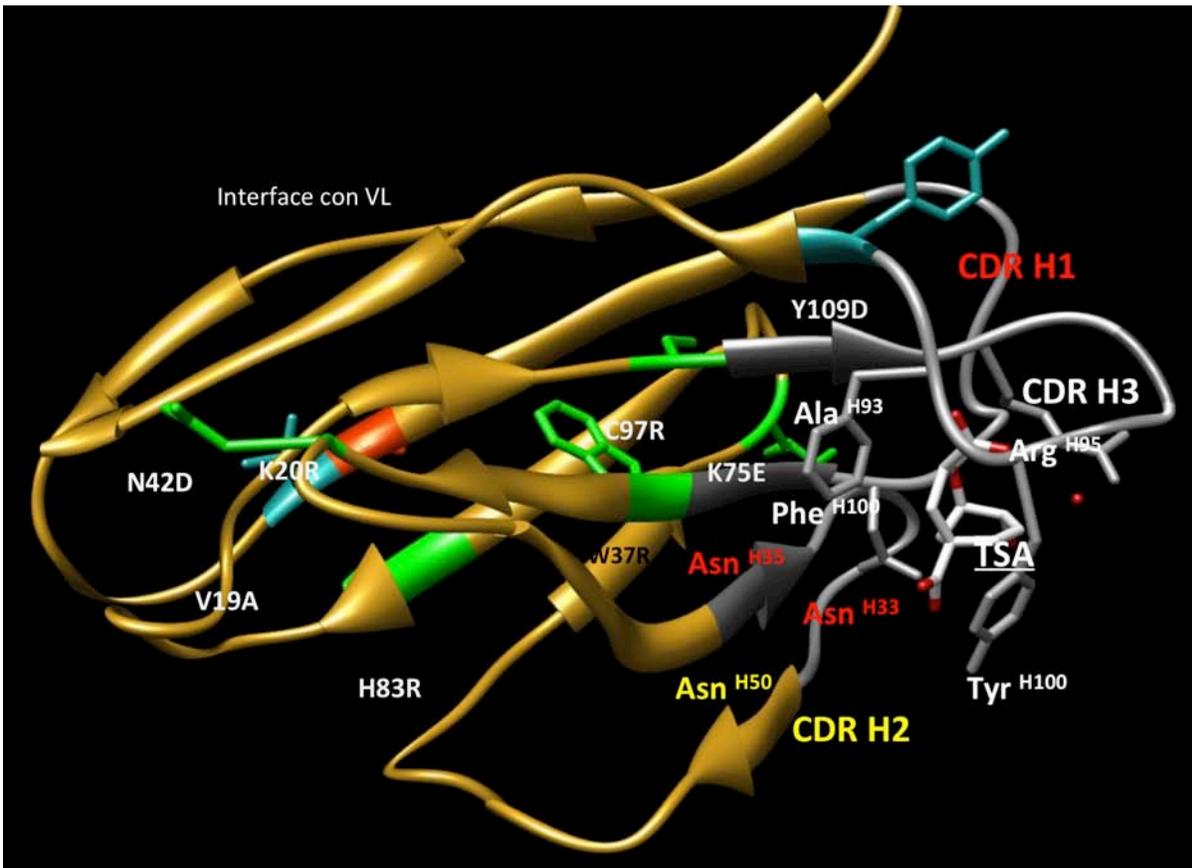


Figura 31. Localización de las mutaciones presentes en las variantes A4, D2 y C11. La imagen fue modificada con el programa *Chimera*, utilizando el archivo PDB 1FIG, correspondiente a la cristalografía del anticuerpo catalítico 1F7. La mutación correspondiente a la variante A4, se muestra en rojo, las mutaciones correspondientes a la variante D2 en verde, y las correspondientes a la variante C11 en color azul.

Respecto a las posiciones de las mutaciones seleccionadas, como se puede observar en la figura anterior, ninguna de estas mutaciones se encuentra localizada en los loops de las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs), ni tampoco en la superficie de contacto con VL.

Ambas mutaciones H83R y C97R (mutaciones seleccionadas en la variante 2), constituyen un cambio por un residuo de arginina. Estos residuos, debido a su cadena lateral de guanidino, son aminoácidos con carga parcial positiva, y por lo tanto capaces de formar interacciones electrostáticas con otros residuos cargados y con el solvente acuoso, permitiendo al fragmento VH tener una mayor solubilidad. Sin embargo, el residuo C97, podría encontrarse formando un puente disulfuro, como se menciona en el Marco Teórico (pág. 14), con su contraparte en VL. Como es mencionado, los residuos de cisteína en las posiciones 22 y 96 en la región VH, y 23 y 88 en la región VL, forman puentes disulfuro que juegan un papel determinante en el mantenimiento de la integridad de los dominios estructurales en las regiones variables. De manera que este residuo de cisteína pudo ser determinante para la estabilidad del dímero de VH.

Respecto a la mutación H83R, de la misma forma, la mutación por arginina puede ayudar a la solubilidad del fragmento VH, debido al grupo guanidino de la arginina, que permanece cargado positivamente a pH fisiológico, además de que estos residuos cargados positivamente (arginina y lisina), se encuentran preferentemente localizados en las superficies de las proteínas, debido a su capacidad de formar interacciones iónicas con el solvente. Por su parte, los residuos de histidina generalmente son importantes debido al valor de su pK_{a3} para su cadena lateral de imidazol, el cual es 6.04. Esto indica que, al tener un valor de pK_a cercano a la neutralidad, a pH fisiológico sería relativamente *fácil* remover protones de la cadena lateral, pudiendo existir esta cadena lateral, tanto de manera neutra o con carga positiva. Esta flexibilidad implica a su vez una cierta ambigüedad en la localización estructural de las histidinas en una proteína, ya que pueden estar localizadas, tanto expuestas al solvente, como enterradas en *cores* hidrofóbicos. Por otro lado, esta flexibilidad en carga, hace a la histidina un aminoácido preferente en sitios proteicos funcionales, como sitios activos o sitios de unión a ligando, sin embargo, este residuo de H83 no se encuentra localizado cercanamente ni en las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs), las cuales son responsables de los contactos hapteno-anticuerpo, y no tendría interferencia en la catálisis de 1F7. Así, dado que la función de este residuo de histidina sería únicamente incrementar la solubilidad de VH, una mutación H83R sería favorable, debido a que un residuo de arginina ($pK_{a3}=12.48$), *siempre* se encontraría cargado positivamente a pH fisiológico, y tendería a localizarse siempre en la superficie en contacto con el solvente, favoreciendo la solubilidad de VH.

Respecto a las mutaciones seleccionadas en la variante 10 en el primer ciclo de evolución dirigida (V19A y Y109D), se puede observar que la posición de la mutación V19A, no se encuentra cercana a las CDRs ni a la interface con VL. Así mismo, tanto valina como alanina constituyen aminoácidos alifáticos, no polares, de manera que el cambio valina por alanina no constituiría un cambio respecto a la solubilidad de VH, por ejemplo. Sin embargo, el hecho de que estos aminoácidos sean alifáticos, confiere importancia respecto a la formación de *cores* hidrofóbicos, cuyas interacciones hidrofóbicas constituyen una de las principales fuerzas estabilizadoras en las proteínas. Se sabe que los aminoácidos con cadenas laterales alifáticas, son propensos a formar interacciones hidrofóbicas, y a formar parte de *cores* hidrofóbicos, debido a su incapacidad de formar interacciones con el solvente acuoso. Esto se debe a que el componente entrópico negativo, relacionado con el ordenamiento de las moléculas de agua alrededor de los residuos alifáticos, constituye un componente termodinámico desfavorable, por lo que los residuos alifáticos tienden a agruparse entre ellos para permanecer fuera del contacto con el solvente, y así incrementar el valor entrópico del sistema al desordenar las moléculas de agua nuevamente. Esto da origen a las interacciones

hidrofóbicas, las cuales son uno de los componentes más importantes en la estabilización de las proteínas. Además, en el caso del fragmento VH, la existencia de *cores* hidrofóbicos cambiaría la orientación espacial de los elementos de estructura secundaria expuestos al solvente.

Respecto a la mutación Y109D, como se menciona en el Marco Teórico (pág. 16), los residuos de tirosina se encuentran entre los aminoácidos localizados preferentemente en los sitios de unión a antígeno de los anticuerpos. Esto se debe a que los residuos aromáticos cuentan con un menor número de grados de libertad conformacionales, teniendo sus reacciones de unión a haptenos un costo entrópico menor, pudiendo además participar en interacciones específicas como puentes de hidrógeno e interacciones no específicas como interacciones de Van der Waals. Además se menciona que los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina, a través de su habilidad para tomar diferentes conformaciones, imparten al sitio de unión a anticuerpos la capacidad para variar su geometría, otra razón por la cual se encuentran en esta localización. Podemos observar que Y109 se encuentra justo al inicio del asa CDR H3, por lo que podríamos justificar su localización debido a las razones expuestas anteriormente, pudiendo tener una función en la catálisis de 1F7. Por otro lado, la mutación a un residuo de aspartato, al ser este un aminoácido cargado negativamente, conferiría solubilidad al fragmento VH.

Respecto a la mutación K20R encontrada en el segundo ciclo de evolución dirigida, éste cambio en realidad no sería demasiado radical como podrían ser algunos de los anteriores, debido a que ambos residuos: lisina y arginina, constituyen residuos cargados positivamente, los cuales son capaces de interaccionar con el solvente acuoso, y ambos se encuentran preferentemente en la superficie de las proteínas.

5.4 Tercer ciclo de evolución dirigida

A partir de las clonas seleccionadas en los dos primeros ciclos de evolución, se prosiguió con el tercer ciclo de evolución dirigida, empleando como método de mutagénesis, *shuffling* o barajado de genes, de acuerdo a los protocolos indicados por Willem P.C. Stemmer e Ira Pastan [24, 46].

Se realizaron diferentes pruebas con ambos protocolos. El protocolo de Ira Pastan [46] se basa en una reacción de digestión con *DNasaI*, utilizando un buffer con $MnCl_2$, pudiendo ser utilizados los fragmentos de digestión como blanco para la reacción de PCR de reensamblado.

Posterior a este proceso, se realizó la clonación en el vector pTrc99A, una posterior transformación a la cepa de clonación MC1061, purificación de plásmido, y la transformación a la cepa de selección FA114 + pACYC.

A partir de un banco de 1,000 col/ml, se continuó con el proceso de selección, el cual incluyó el mismo procedimiento que en ciclo de evolución anterior, basado en cinéticas de crecimiento en medio de complementación, en placas de 96 pozos.

A partir de la cinética de crecimiento en medio de complementación, se seleccionaron a las variantes: A1, A2, A3, A10, A11, B10, D7, D9, D10, D11, E10 y H5. En la figura 32 se muestran las curvas de crecimiento para algunas las variantes mencionadas. De la misma manera que los gráficos del segundo ciclo de evolución, sólo se muestran algunas de las variantes representativas, debido a la dificultad de mostrar las cinéticas para las 96 variantes evaluadas. Las variantes B10, D11 y A10 mostradas en la figura 33, conservaron el conector de cuatro glicinas y una serina incorporado a la construcción VH_{1F7}-PDH, a diferencia de las variantes A11, E10 y H5.

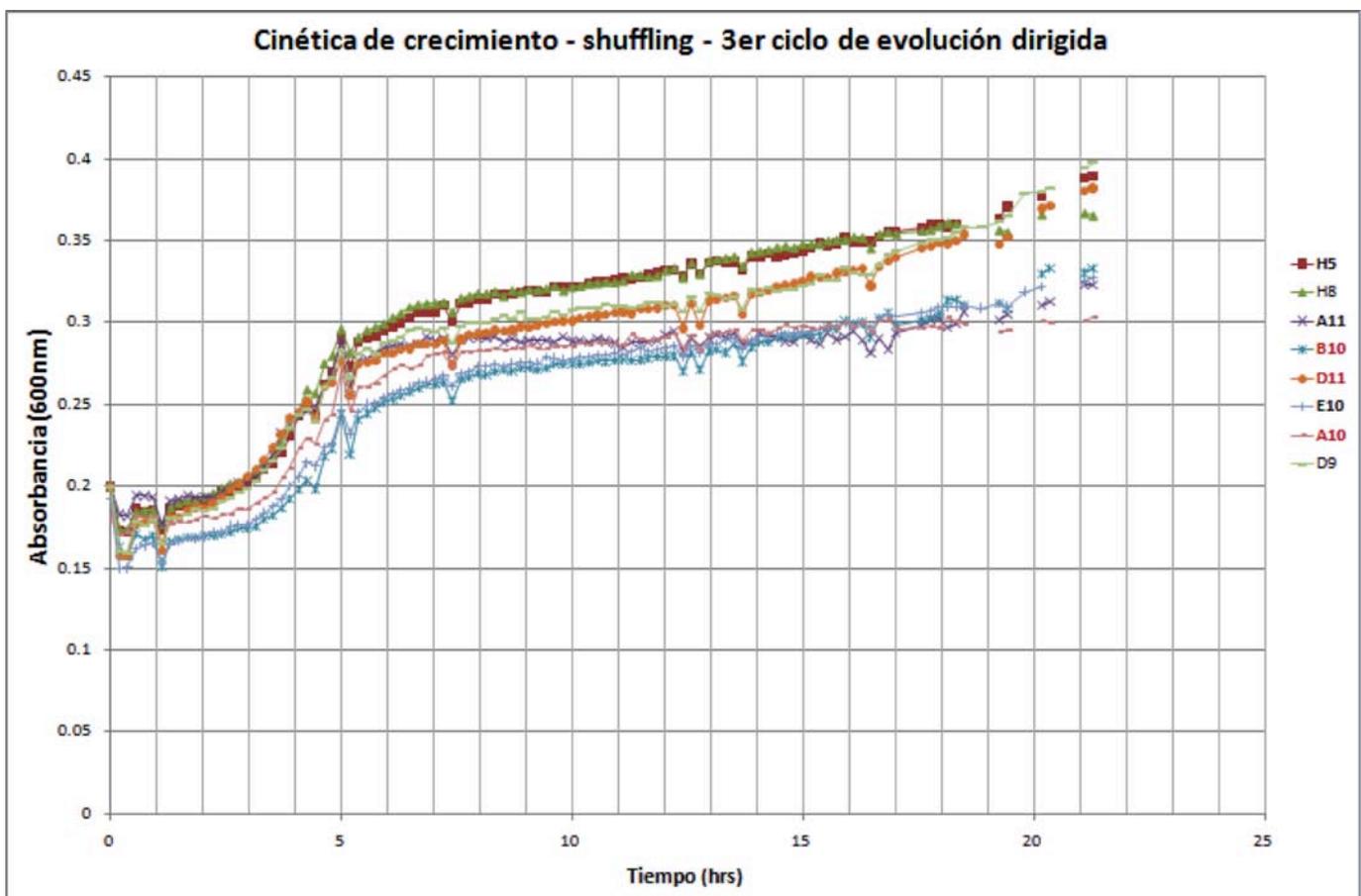


Figura 32. Cinéticas de crecimiento de las variantes evaluadas en el tercer ciclo de evolución dirigida. Placas de 96 pozos, a 30°C, realizando mediciones de D. O. a 600nm.

Los genes que codifican para las variantes: A1, A2, A3, A10, A11, B10, D7, D9, D10, D11, E10 y H5 fueron secuenciados, encontrándose que sólo las variantes A10, A11, B10, D11, E10 y H5, mostraban una construcción VH-PDH correcta (las demás secuencias presentaban deleciones de fragmentos de VH_{1F7}). Sin embargo, como se indica en la figura 34, las variantes A11, E10 y H5, perdieron el conector de cuatro glicinas y una serina, utilizado desde las primeras clonaciones, para mejorar el contacto entre VH y TyrA_{Ec}. Las variantes A10, B10 y D11, sí conservaron dicho conector.

	
		5	15	25	35	45
VH wt		MDVQLQQSGP	ELEKPGASVK	ISCKASGFSL	PGHNINWIVQ	RNGKSLEWIG
4356 A10		MDVQLQQRSGP	ELEKPGASVK	ISCKASGFSL	PGHNINWIVQ	RNGKSLEWIG
4357 A11		MDVQLQQSGP	ELEKPGASV	ISCKASGFSL	PGHNINWIVQ	RNGKSLEWIG
4358 B10		MDVQLQQSGP	ELEKPGASVK	ISCKASGFSL	PGHNINWIVQ	RNGKSLEWIG
4362 D11		MDVQLQQSGP	ELEKPGASVK	ISCKASGFSL	PGHNINWIVQ	RNGKSLEWIG
4363 E10		MDVQLQQSGP	ELEKPGASAK	ISCKASGFSL	PGHNINWIVQ	RNGKSLEWIG
4364 H5		MDVQLQQSGP	ELEKPGASV	ISCKASGFSL	PGHNINWIVQ	RNGKSLEWIG
	
		55	65	75	85	95
VH wt		NIDPYYGGTN	FNPKFKGKAT	LTVDKSSSTL	YMHLTSLQSE	DSAVYYCARR
4356 A10		NIDPYYGGTN	FNPKFKGKAT	LTVDKSSSTL	YM HL TSLQSE	DSAVYYCARR
4357 A11		NIDPYYGGTN	FNPKFKGKAT	LTVDKSSSTL	YMHLTSLQSE	DSAVYYCARR
4358 B10		NIDPY F GGTN	FNPKFKGKAT	LTVDKSSSTL	YMHLTSLQSE	DSAVYYCARR
4362 D11		NIDPY F GGTN	FNPKFKGKAT	LTVDKSSSTL	YMHLTSLQSE	DSAVYYCARR
4363 E10		NIDPYYGGTN	FNPKFKGKAT	LTVDKSSSTL	YMR PT GLQSE	DSAVYYCARR
4364 H5		NIDPYYGGTN	FNPKFKGKAT	LTVDKSSSTL	YMR PT SLQSE	DSAVYYCARR
	
		105	115	125		
VH wt		RDGNYGFTYW	GQGTLVTVT	GGGS	LQX	
4356 A10		RDGNYGFTYW	GQGTLVTVT	GGGP	CX.	
4357 A11		RDGNYGFTYW	GQGTLVTVT		LQ.	
4358 B10		RDGNYGFTYW	GQGTLVTVT	GGGS	LQ.	
4362 D11		RDGNYGFTYW	GQGTLVTVT	GGGS	LQ.	
4363 E10		RDGNYGFTYW	GQGTLVTVT		LQ.	
4364 H5		RDGNYGFTYW	GQGTLVTVT		LQ.	

Figura 33. Secuencia de las variantes seleccionadas en el tercer ciclo de evolución. Como se puede observar, las variantes seleccionadas A11, E10 y H5, carecen del linker de 4 residuos de glicina y uno de serina, que fue utilizado para realizar la conexión entre el fragmento VH de 1F7 y la proteína PDH.

La eliminación del conector en algunas de las variantes seleccionadas por crecimiento en medio de complementación, pudo deberse a una presión de selección específica. El cuadro 8 muestra las mutaciones encontradas en estas variantes seleccionadas:

Variante 3er ciclo de evolución	Mutaciones
A10	H83L
A11*	K20R
B10	L5P, Y55F
D11	L5P, Y55F
E10*	V19A, H83R, L84P, S86G
H5*	K20R, H83R, L84P

Cuadro 8. Mutaciones encontradas en las variantes seleccionadas en el tercer ciclo de evolución dirigida. Las variantes que se indican con un asterisco, no contienen el conector de cuatro glicinas y una serina.

En resumen, en este tercer ciclo de evolución, se utilizó la técnica de shuffling para introducir variabilidad, de manera que pudieran conservarse y mezclarse, las mutaciones seleccionadas en los ciclos anteriores. Las variantes A11, E10 y H5 fueron seleccionadas, conservando el linker de cuatro glicinas y una serina, (empleado desde el inicio para mejorar el contacto entre VH_{1F7} y PDH), mientras que las variantes A10, B10 y D11, sí conservaron dicho conector.

5.5 Cuarto ciclo de evolución dirigida

En un cuarto ciclo de evolución dirigida, se realizó una mezcla entre las variantes A11, E10 y H5, sin conector, y por su parte las variantes A10, B10 y D11, con conector. Posteriormente se aplicó la metodología de *shuffling* [46], a las mezclas con conector y sin conector.

Los resultados correspondientes al banco sin conector, no mostraron crecimiento de colonias, aún en un medio sin selección, mientras que a partir de las variantes con conector, se obtuvo un banco de 8×10^5 col/ml.

Se procedió a evaluar este banco en medio de complementación sin tirosina, utilizando placas de 96 pozos.

En la figura 34 se muestran las curvas de crecimiento de las clonas evaluadas:

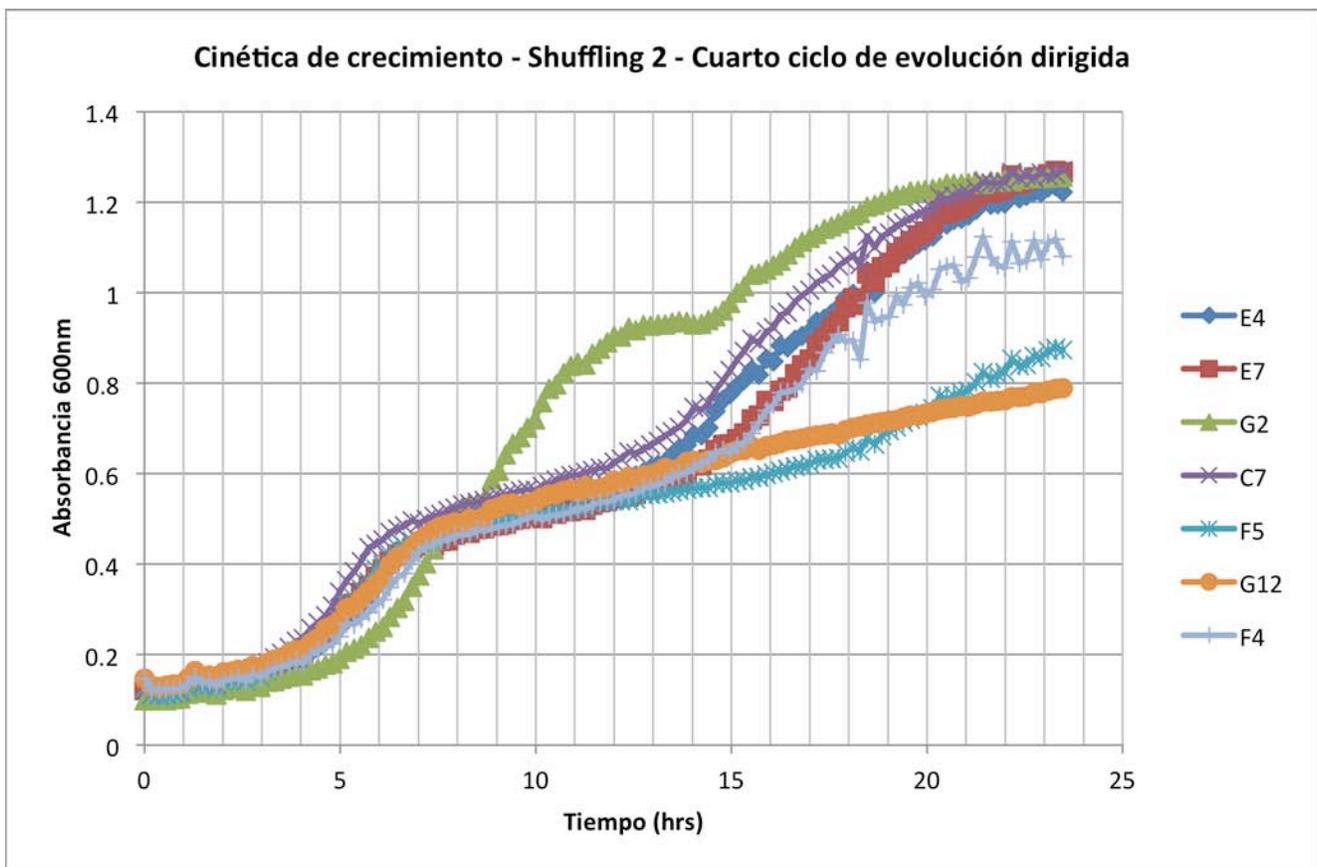


Figura 34. Cinética de crecimiento en medio de complementación de variantes evaluadas en el cuarto ciclo de evolución dirigida, en placas de 96 pozos, a 30°C, realizando mediciones de D.O. a 600nm.

Como se puede observar, las variantes identificadas como E4 y E7, presentaron mejor crecimiento y una buena construcción VH_{1F7}-PDH. Sin embargo, los resultados de secuencia indicaron que tanto la variante E4 como la E7, no presentaban mutaciones, sino que presentaban la secuencia del VH silvestre.

Se decidió ya no continuar con los ciclos de evolución dirigida. A continuación se muestra una tabla con las mutaciones seleccionadas en cada ciclo de evolución dirigida, además de una figura que ilustra la posición de las principales mutaciones seleccionadas:

VARIANTES	1 ^{er} ciclo	2 ^o ciclo	3 ^{er} ciclo
2	H83R, C97R		
10	V19A, Y109D		
3(2)		H83R, C97R, L71S, L84P	
3(10)		H83R, Y109D	
5(10)		Y109D	
A4		K20R	
D2		H83R, C97R, W37R, N42D, K75E	
C11		V19A, G103D, Y109D	
A11			K20R, Y81C
E10			V19A, H83R, L84P, S86G
H5			K20R, H83R, L84P

Cuadro 9. Mutaciones seleccionadas en tres ciclos de evolución dirigida.

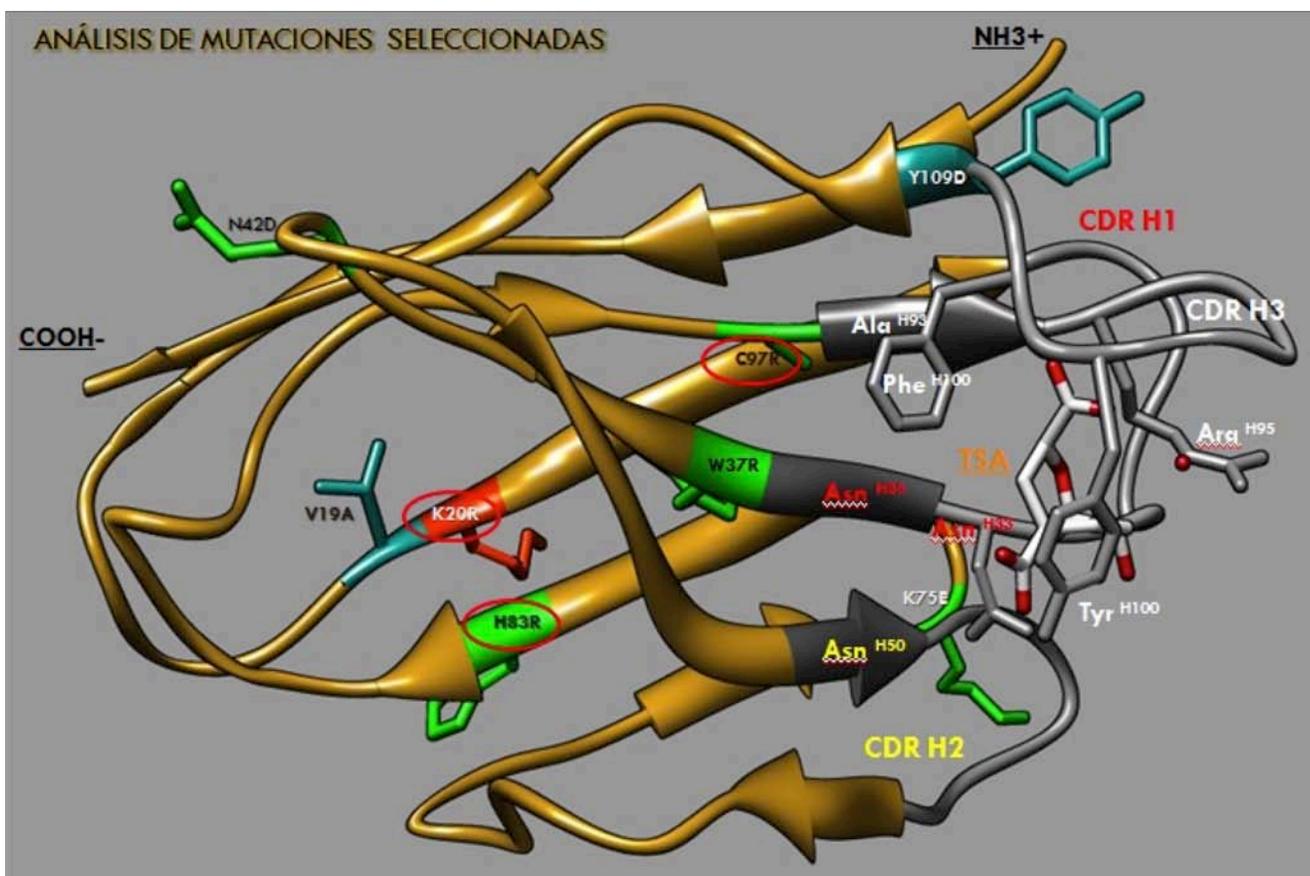


Figura 35. Localización de las mutaciones seleccionadas en los tres ciclos de evolución dirigida realizados. Las mutaciones mostradas en verde representan a aquellas provenientes del Banco 2, las localizadas en azul provienen del Banco 10; la mutación roja K20R, proviene del Banco I (variante A4). Figura modificada del PDB 1FIG.

Se procedió con los ensayos por triplicado de complementación de actividad de PDH y CM, solo de las variantes seleccionadas en los tres ciclos de evolución.

5.6 Complementación de actividad de PDH de las variantes seleccionadas

5.6.1 Complementación en medio líquido

Primeramente se realizó una cinética de crecimiento en medio de complementación, por triplicado, para las 12 variantes elegidas, encontrándose mejor crecimiento en las variantes A4, 3(2) y A11. Esta cinética se realizó en tubos de ensayo de vidrio, realizando mediciones de crecimiento en medio de complementación sin tirosina, a 600nm, en un volumen final de 2ml, durante 28hrs (Ver Anexos).

Posteriormente se realizó un segundo experimento de complementación en líquido, evaluando las 12 variantes seleccionadas en los 3 ciclos de evolución dirigida, utilizando el control positivo *tyrA* ($AroQ_T - TyrA_{Ec}$). El experimento fue realizado a partir de crecimiento en medio LB con los antibióticos Km, Amp y Cm, (se lavaron posteriormente con sales M9), para tomar posteriormente 2 μ Lts e inocular en 2ml de medio de complementación sin tirosina. Los ensayos fueron realizados sin IPTG, y a concentraciones de 100 μ L y 500 μ L de IPTG y con 100 μ L de IPTG más tirosina. Se utilizaron tubos de vidrio de 5ml, para poder medir la densidad óptica directamente en el espectrofotómetro a 600nm, a diferentes intervalos de tiempo. Las cinéticas se muestran en las figuras 36-39:

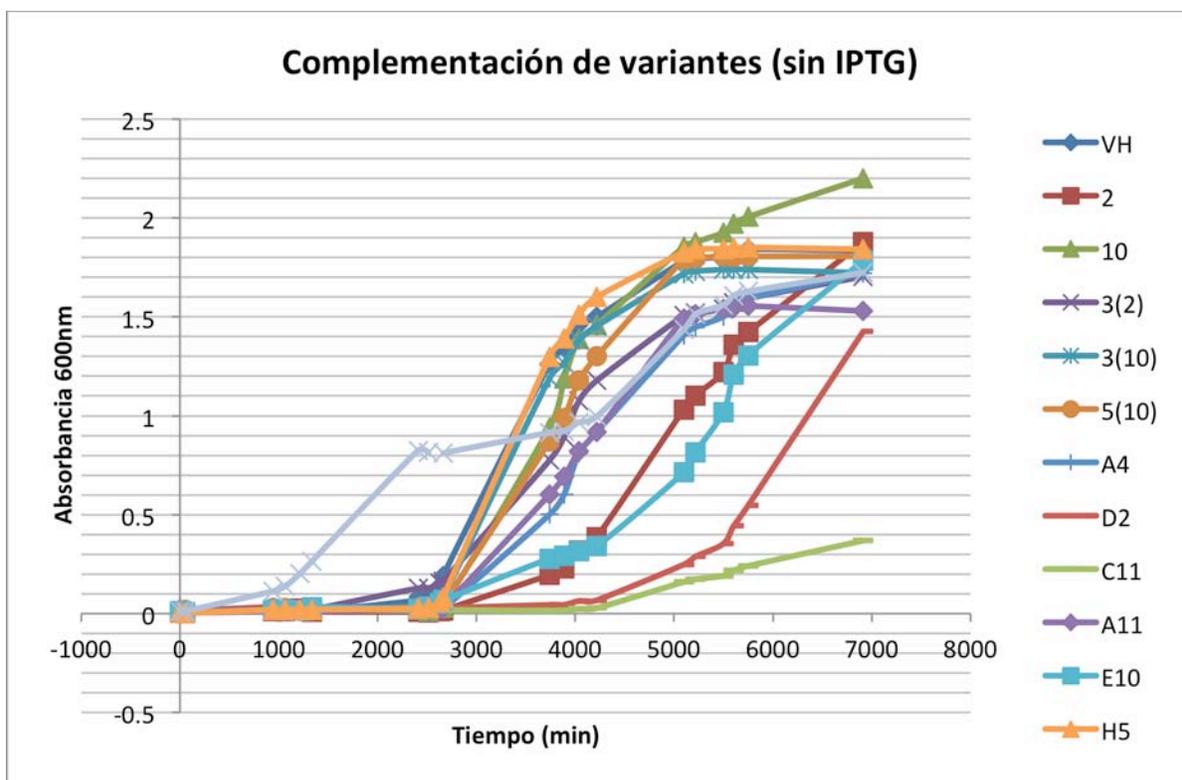


Figura 36. Crecimiento en medio de complementación de variantes obtenidas en 3 ciclos de evolución dirigida, sin IPTG.

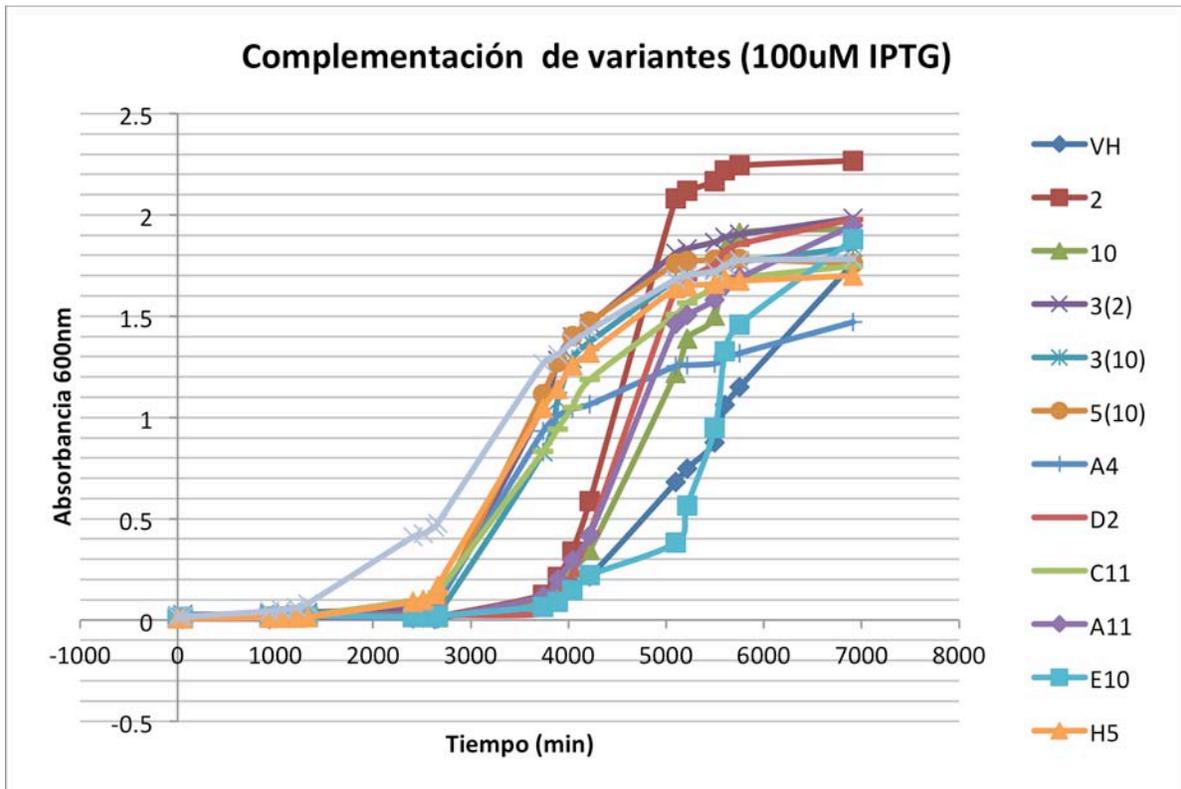


Figura 37. Crecimiento en medio de complementación de variantes obtenidas en 3 ciclos de evolución dirigida, a 100µM de IPTG.

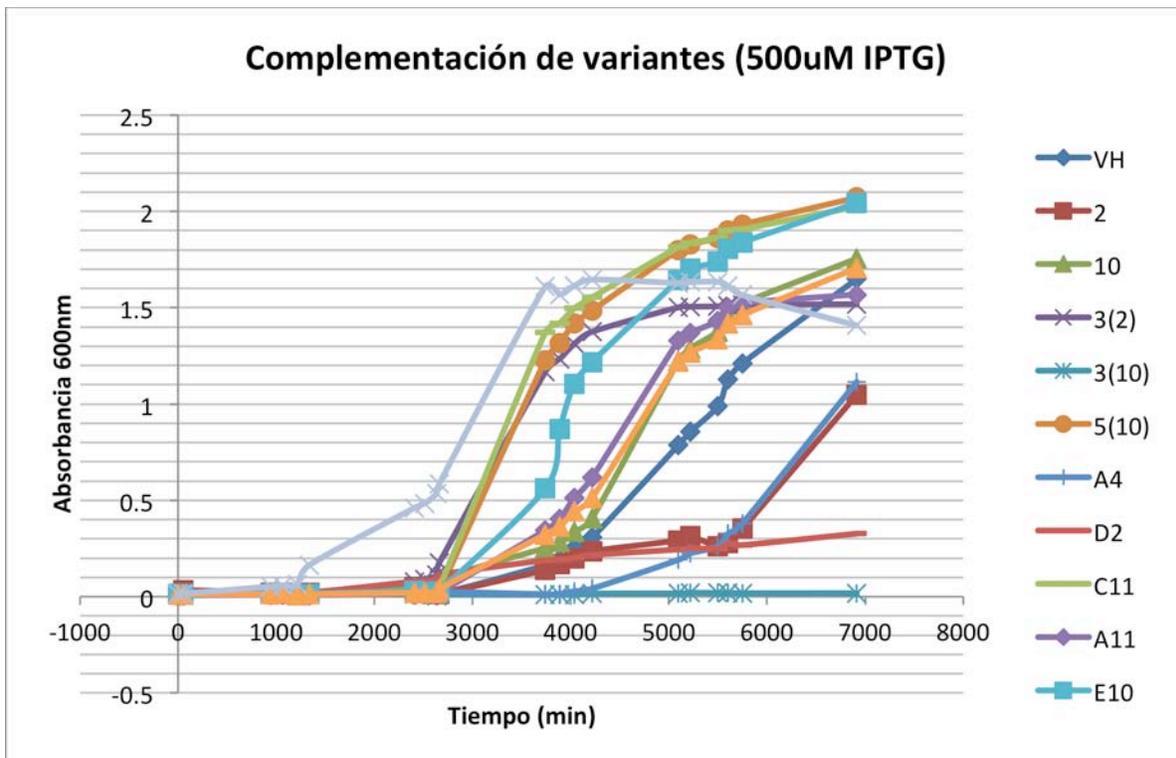


Figura 38. Crecimiento en medio de complementación de variantes obtenidas en 3 ciclos de evolución dirigida, a 500µM de IPTG.

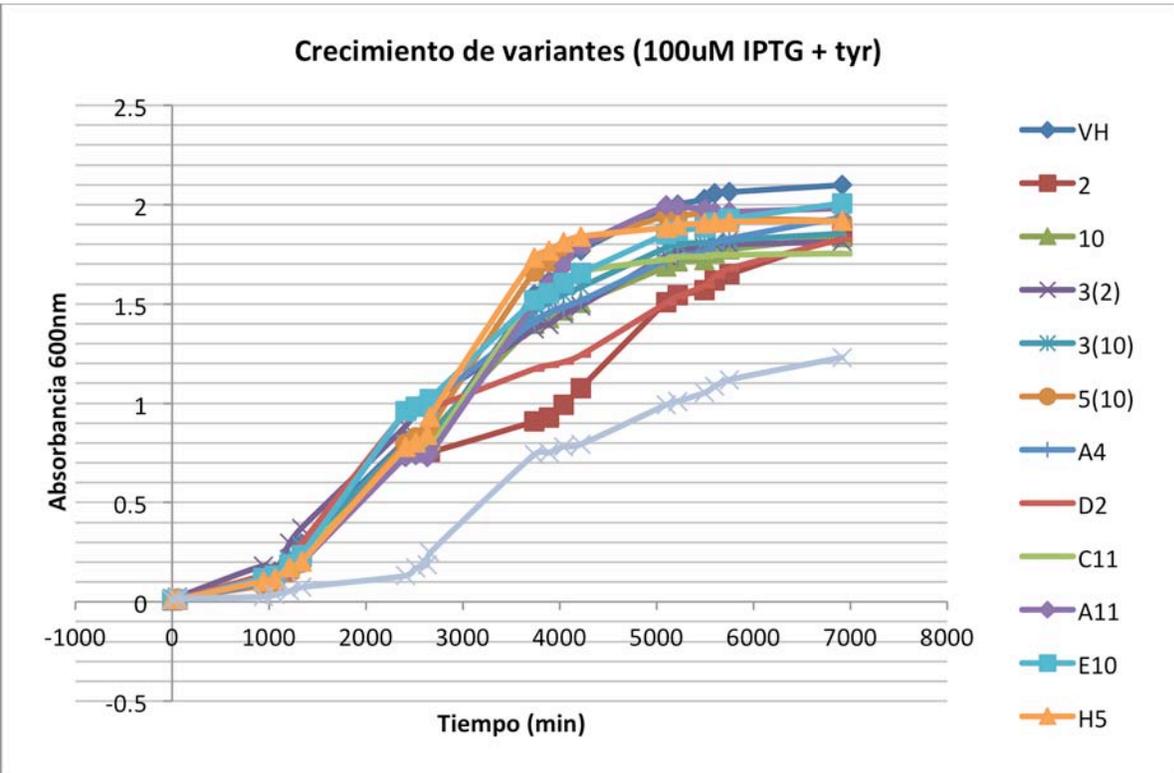


Figura 39. Crecimiento en medio de complementación de variantes obtenidas en 3 ciclos de evolución dirigida, a 100 μ M de IPTG y tirosina, como control positivo.

Como se puede observar en la figura 48, referente al crecimiento de la variante control positivo, *tyrA* (*TyrA_{Ec}-AroQ_T*), la curva morada muestra el crecimiento con adición de tirosina, la cual presentó un crecimiento siempre por debajo de las curvas sin tirosina, lo cual puede deberse a la inhibición que presenta PDH por este aminoácido, que constituye el producto final de la ruta biosintética de la que forma parte PDH.

En general, se pudo observar un mejor crecimiento utilizando 100 μ M de IPTG, en comparación con una concentración mayor (500 μ M IPTG). Esto pudiera deberse a que una sobreproducción de la proteína resultara tóxica para las células.

En resumen, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio de complementación líquido, no adicionando IPTG, y adicionando 100 y 500 μ M de IPTG, utilizando como control positivo medio con tirosina y 100 μ M de IPTG, además de la variante *tyrA*. Se determinó crecimiento mediante lecturas de densidad óptica a 600nm, a intervalos de 2 hrs durante 5 días. Se observó buen crecimiento en todas las variantes, sobresaliendo las variantes 3(2) y 5(10), las cuales fueron elegidas para una mayor caracterización de su actividad y niveles de expresión.

5.7 Complementación de actividad de PDH y CM de las variantes seleccionadas

5.7.1 Complementación en medio sólido

Para realizar este experimento, se llevó a cabo la transformación de la cepa FA114 de *E. coli* con las variantes obtenidas, **sin** el plásmido accesorio pACYC, el cual contiene el gen codificante para la enzima CMPheA (dominio corismato mutasa del gen *pheA*, el cual codifica para la enzima corismato mutasa como parte de la ruta biosintética de la fenilalanina [47]). Así, la actividad de corismato mutasa existente, sólo provendría del fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7.

El primer experimento realizado, se diseñó utilizando cajas con medio de complementación (M9C) sólido, con diferentes concentraciones de IPTG (5 y 500 μM), y un control con tirosina a 100 μM de IPTG. Se depositaron gotas de 5 μL s de cultivo en el medio sólido, evaluando las 12 variantes elegidas de los tres ciclos de evolución, además de la variante *tyrA* (AroQt - PDH) como control positivo.

Estos experimentos mostraron buen crecimiento para todas las variantes, observándose sin embargo, un gradiente de crecimiento que tendía, desde la variante *tyrA* hacia las demás variantes (Ver Anexos). Se realizaron repeticiones de este experimento, sin la variante *tyrA* (para evitar falsos positivos debido a la producción de tirosina), añadiendo 100 μM de IPTG como concentración a evaluar, y con un control positivo con tirosina a 100 μM de IPTG. Se realizaron triplicados de todas las cajas, utilizándose además triplicados de cultivos con diluciones 1/1000 y cultivos sin diluir, evaluando gotas de 5 μL s.

Los resultados muestran que los controles con tirosina presentaron un crecimiento uniforme después de 2 días de incubación. Respecto a las cajas con diferente concentración de IPTG, en ninguna se encontró crecimiento, tanto en cajas de cultivo sin dilución y con dilución 1/1000 del cultivo.

Después de 5 días de incubación, los triplicados con 5, 100 y 500 μM de IPTG, no mostraron crecimiento. A 500 μM de IPTG la posibilidad de contaminación es muy alta, en comparación con 5 μM de IPTG, cuyos triplicados no presentaron contaminación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente, obteniéndose el mismo resultado.

Los resultados indican crecimiento positivo en los controles con tirosina desde los dos días de incubación, tanto en los cultivos con dilución 1/1000 como sin dilución, y crecimiento nulo en las cajas sin tirosina. A cinco días de incubación, en las cajas sin tirosina no se observó crecimiento en ninguna concentración de IPTG. (Ver Anexos).

En resumen, para los experimentos de actividad de corismato mutasa en cajas de medio complementación sólido, se evaluó por triplicado el crecimiento de 3 μ Lts de cultivo, en concentraciones de 5, 100 y 500 μ M de IPTG, en cultivo sin diluir, y en diluciones 1/1000, utilizando un control con tirosina a 100 μ M de IPTG, con y sin dilución. Los resultados a dos días de incubación, mostraron crecimiento en todos los controles con tirosina, y crecimiento nulo en todas las concentraciones de IPTG. A 5 días de incubación tampoco se observó crecimiento en cultivos sin diluir ni diluidos, además de presentar una alta probabilidad de contaminación en 100 y 500 μ M de IPTG.

5.8 Ensayos de expresión de variantes seleccionadas

La expresión de las variantes obtenidas de los tres ciclos de evolución dirigida, se evaluó en geles de poliacrilamida, al 12.5%. Se realizó una transformación a la cepa de selección FA114 de *E.coli*, de los plásmidos pTrc99A, conteniendo las fusiones de las variantes de VH_{1F7} con TyrA_{EC}. El tamaño de banda esperada es de 46 kDa; el tamaño de la proteína de fusión VH-PDH es de 420 aminoácidos (124 aminoácidos por parte de VH_{1F7} y 296 aminoácidos de la proteína TyrA_{EC}). Los geles de expresión se muestran en las figuras 40 y 41.

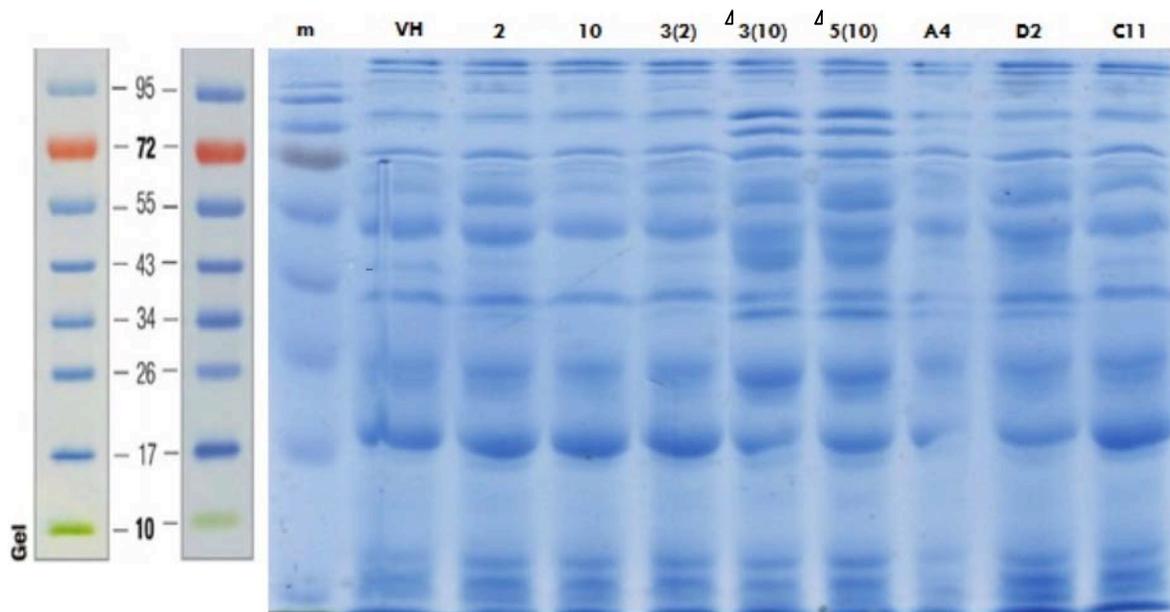


Figura 40. Gel de poliacrilamida al 12.5%, en el que se muestra la expresión en proteína soluble, de las variantes 2 - C11. Tamaño de banda esperado: 46KDa.

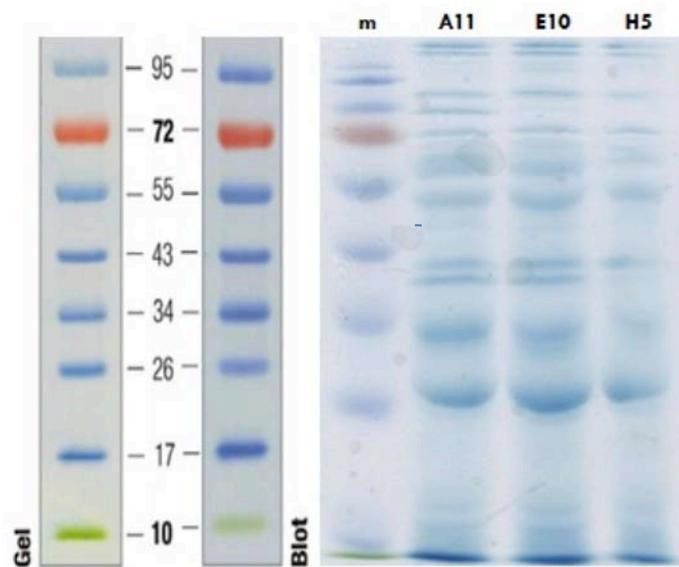


Figura 41. Gel de poliacrilamida 12-5%. Expresión de proteína soluble. Variantes A11-H5. Tamaño de banda esperado: 46kDa.

De acuerdo a los geles presentados, no se observa banda a 46kDa, a excepción de las variantes 3(10) y 5(10) (figura 41). Esto puede deberse a que no hubo proteína soluble expresada, ya que la proteína a evaluar en estos geles es proteína soluble, no proteína pura.

A partir de nuevos ensayos de expresión se realizó una cinética de crecimiento de 12hrs (Véase Anexos), y geles de poliacrilamida evaluando el nivel de proteína total soluble e insoluble (figuras 42, 43 y 44).

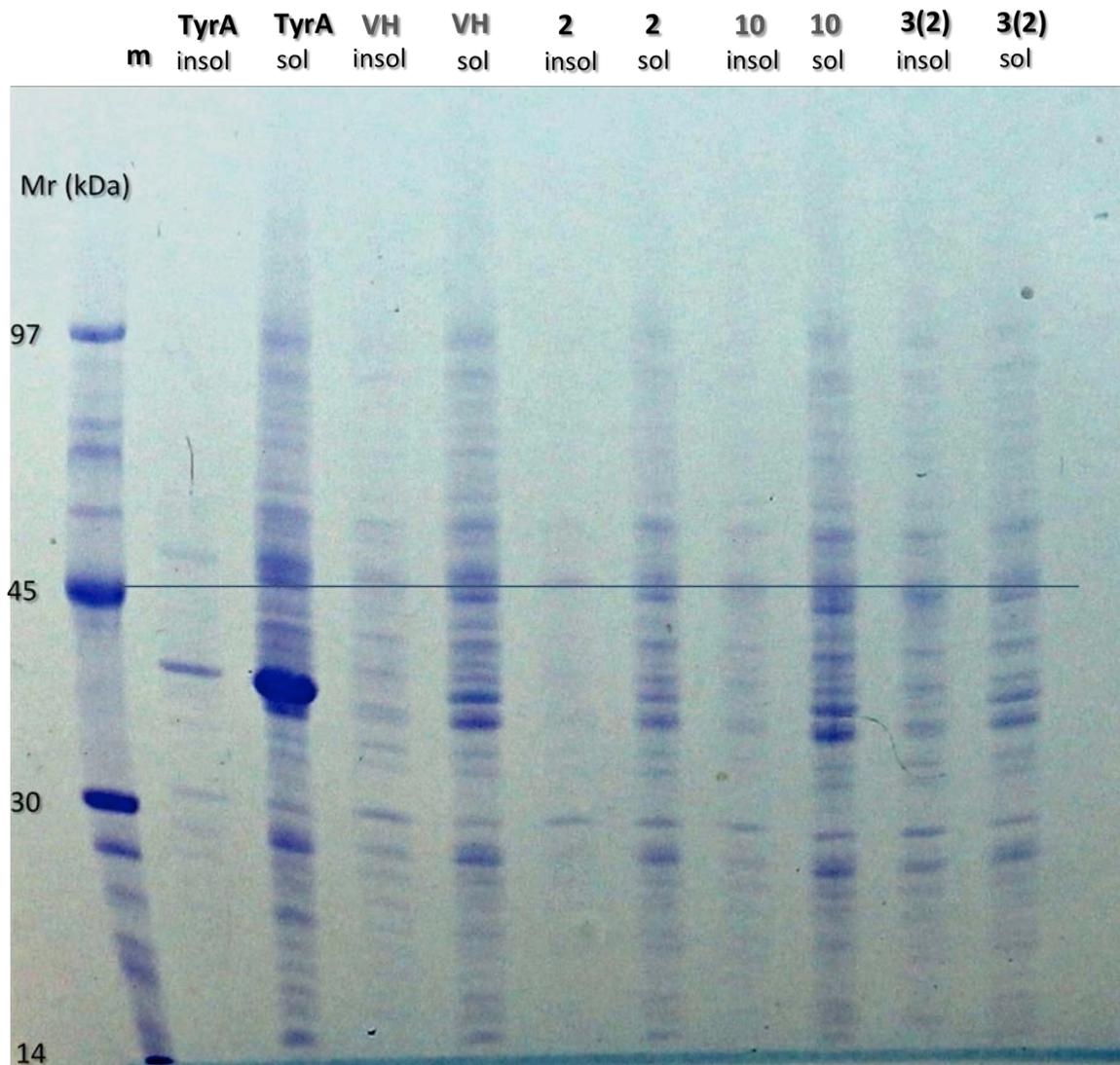


Figura 42. Expresión de proteína de variantes seleccionadas. Se analizó proteína total, fracciones soluble e insoluble de las variantes VH - 3(2). El tamaño de banda esperado es de 46 kDa. PAGE 12.5 %.

Como se muestra en las figuras 43, 44 y 45, una banda de 46 kDa se observa en la fracción soluble de todas las variantes. Observándose una banda más intensa en las variantes 3(10) y 5(10). La proteína T, utilizada como control (*tyrA*), es de 373 aminoácidos, y cuenta con un peso molecular de 40.85 KDa. Como se muestra en la figura 51, se observa una banda con gran contenido de proteína soluble a una altura de 40 kDa en el carril *tyrA*.

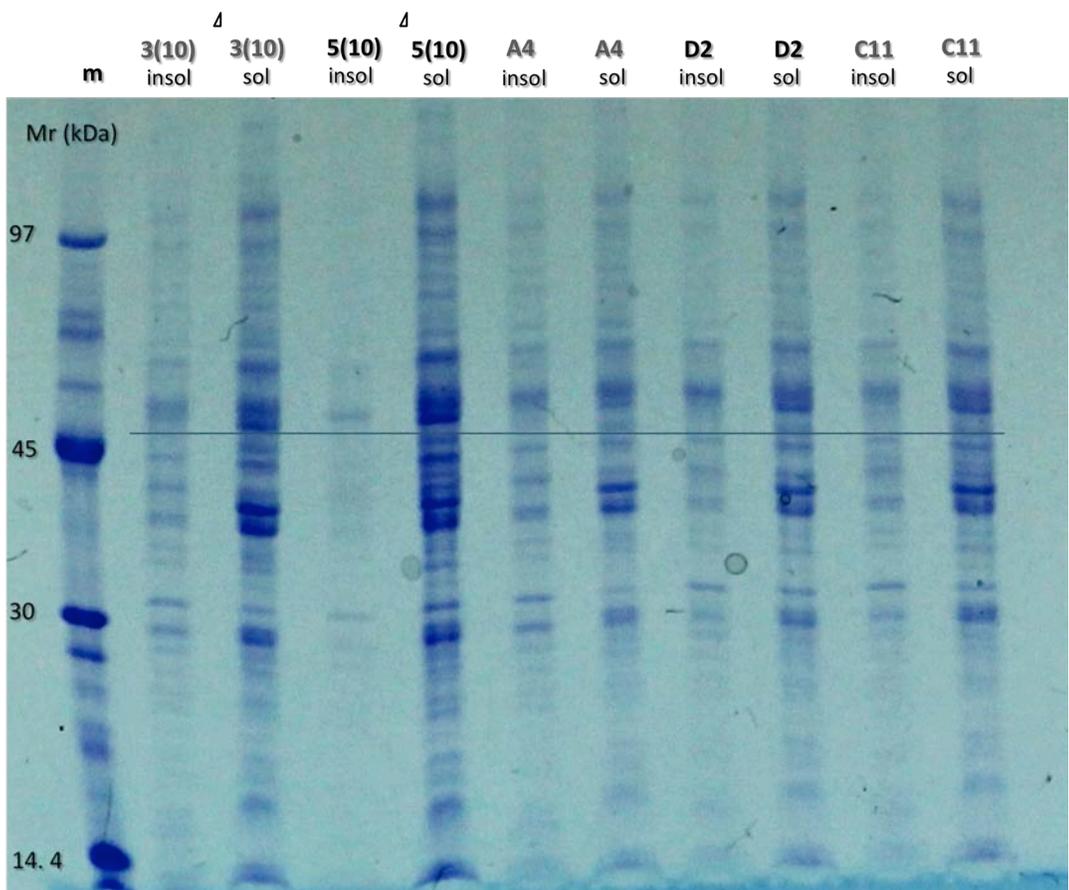


Figura 43. Gel de poliacrilamida al 12.5% que muestra el nivel de expresión en proteína total, de las variantes 3(10) - C11. Tamaño de banda esperado: 46kDa.

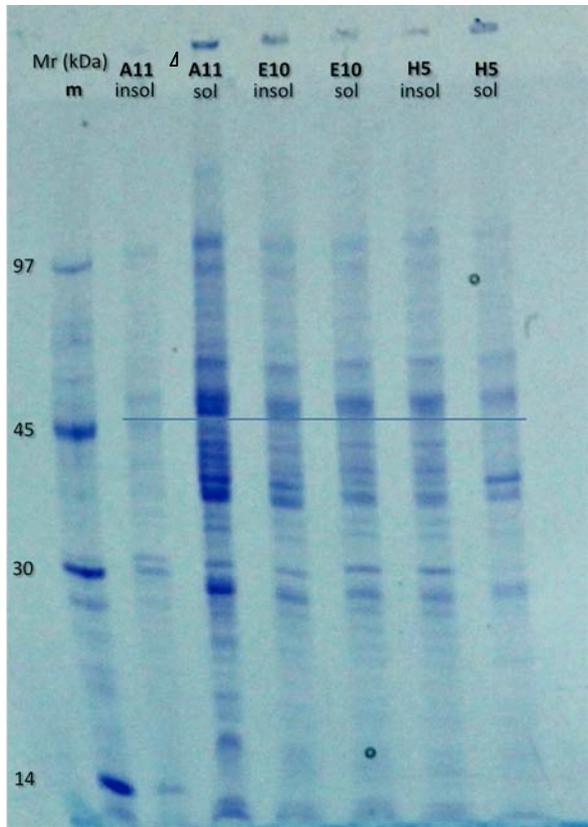


Figura 44. Gel de poliacrilamida al 12.5% que muestra el nivel de expresión en proteína total, de las variantes A11-H5. Tamaño de banda esperado: 46kDa.

5.9 Expresión de las variantes: 3(2) y 5(10)

Posteriormente se realizaron experimentos de expresión y actividad para las variantes VH, 3(2) y 5(10). Estas variantes mostraron mejor crecimiento en el experimento de complementación de actividad de TyrA_{Ec} en medio líquido (figuras 45-48).

Se intentó realizar el experimento de expresión con la variante C11, sin embargo su crecimiento en 500 μ M de IPTG dio como resultado una lisis celular, indicando toxicidad por parte de ésta variante.

Los experimentos de expresión fueron realizados en cultivos de 15ml a 30°C con agitación, posteriormente las células se colectaron y lisaron por sonicación. La figura 45, muestra un gel de poliacrilamida al 12.5% cargado con proteína total, en sus fracciones soluble e insoluble.

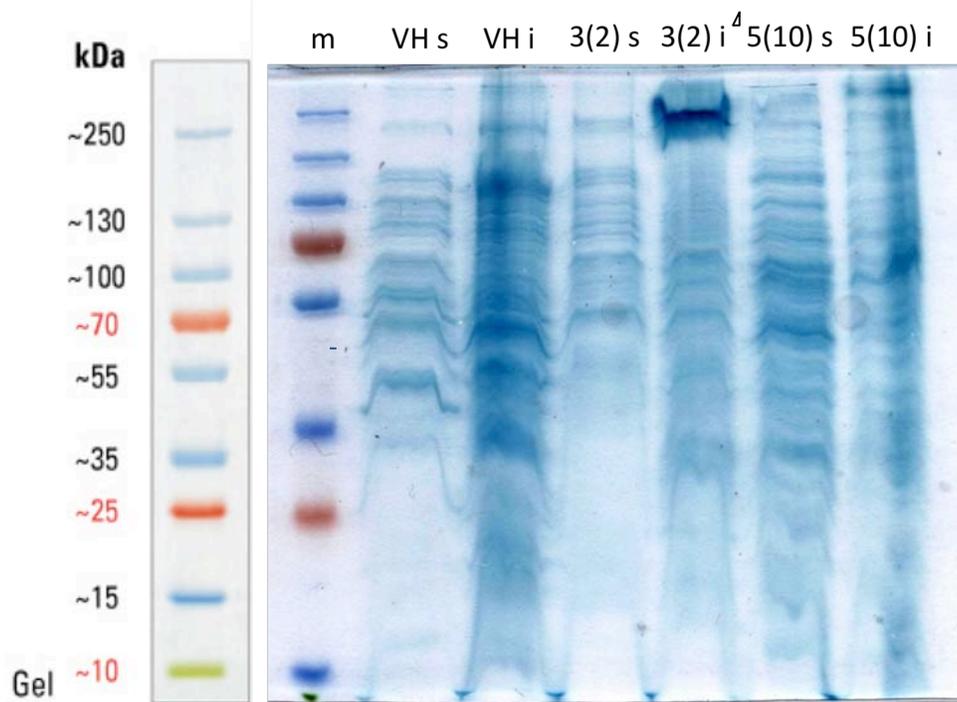


Figura 45. Gel de poliacrilamida al 12.5%, mostrando el contenido de proteína total (soluble e insoluble). De las variantes VH, 3(2) y 5(10), respectivamente. Tamaño de banda esperado: 46kDa.

El tamaño de banda esperado, es de 46 kDa. Como se observa, existe una mayor cantidad de proteína insoluble en el caso de VH, mientras que en el caso de la variante 5(10), es posible localizar mayor contenido de proteína soluble.

Así mismo, a partir de la fracción soluble de los productos de sonicación, se realizaron ensayos por triplicado de actividad de pefenato deshidrogenasa (Ver Anexos).

En resumen, respecto a la expresión de las variantes 3(2) y 5(10), se muestra un mayor contenido de proteína insoluble en VH y 3(2), mientras que en 5(10) se observó mayor contenido en proteína soluble.

5.10 Caracterización de variantes obtenidas

Posterior a los eventos de evolución dirigida realizados, así como a la expresión y medición de actividades de pefenato deshidrogenasa y corismato mutasa, se procedió a la caracterización mediante otros métodos, de las variantes obtenidas.

5.10.1 Clonación con GFP

Para la caracterización del nivel de expresión, se realizó la fusión de las variantes con la proteína GFP (Green Fluorescent Protein), de forma que GFP pudiese ser usada como reportero de expresión [48].

La clonación de GFP fue llevada a cabo entre los sitios de restricción *PstI* - *HindIII*, de la misma manera en que la proteína TyrA_{Ec} (pefenato deshidrogenasa de *E. coli*) se encontraba clonada en los experimentos anteriores de evolución, junto a las variantes del fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7. En la figura 46 se muestra un esquema de la clonación realizada:

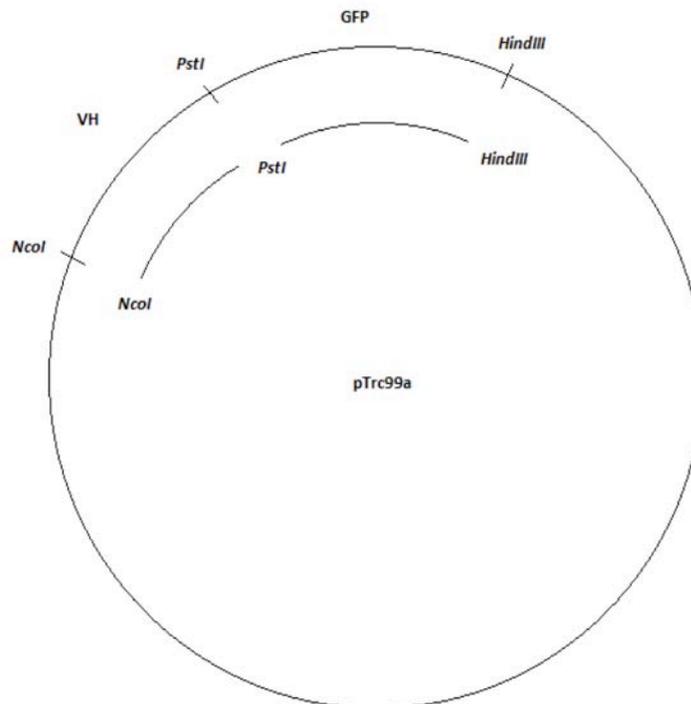


Figura 46. Esquema de la construcción VH-GFP realizada en el vector pTrc99A.

Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de fluorescencia para evaluar el nivel de expresión de cada una de las variantes. Estos ensayos incluyeron el registro de los espectros de emisión de fluorescencia a 504nm (figura 56) excitando a 474nm. Como se puede ver en la figura 47, las variantes 5(10), E10 y H5 mostraron mayores niveles de emisión de fluorescencia a 504nm.

	Triplicados (504nm)			promedio	σ (DE)
Control negativo					
VH	304.22	299.23	271.53	291.66	17.611
2	192.7	241.78	181.25	205.24	32.155
10	183.33	374.07	235.53	264.31	98.573
3(2)	176.39	201.53	251.76	209.89	38.3747
3(10)	307.17	223.33	291.56	274.02	44.587
5(10)	207.54	432.06	389.01	342.87	119.159
A4	221.85	218.82	289.93	243.53	40.209
D2	204.12	252.65	230.37	229.05	24.292
C11	153.2	147.7	334.21	211.71	106.129
A11	142.24	149.07	146.77	146.03	3.475
E10	266.3	269.42	353.6	296.44	49.526
H5	380.94	350.74	207.28	312.98	92.781

Cuadro 10. Fluorescencia de las variantes fusionadas con GFP midiendo a 504nm en espectro de emisión, se muestran además las desviaciones estandar de los valores por triplicado.

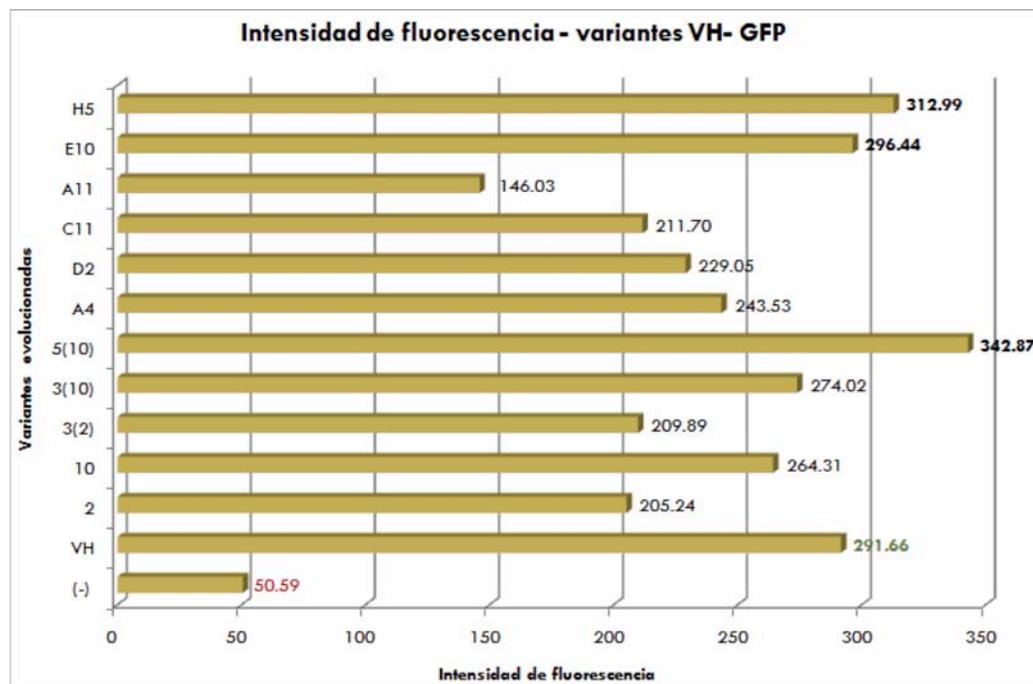


Figura 47. Valores promedio obtenidos a partir de triplicados de mediciones de emisión de intensidad de fluorescencia a 504nm.

Posteriormente, se realizaron experimentos de estridados de las variantes en cajas de medio LB sólido, por triplicado, observando fluorescencia en el fluorímetro, sin embargo, no se observó fluorescencia en ninguna construcción.

La fusión con la proteína GFP de las variantes, demostró que E10, 5(10) y H5, presentaron la mayor intensidad de fluorescencia y por lo tanto la mayor expresión.

5.10.2 Clonación con colas de histidina

Para la purificación de las variantes se decidió colocarles una cola de histidinas. El proceso de clonación incluyó la fusión de una cola de 6 histidinas en el extremo C-terminal del fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7, introduciendo el sitio de restricción *HindIII*, a manera de purificar las proteínas de forma independiente a preferato deshidrogenasa (TyrA_{EC}). El proceso de clonación sólo se realizó para las variantes 2, 10 y A4, además del fragmento VH sin mutaciones, eligiendo así solamente unas variantes iniciales para evaluar el procedimiento de purificación en columna de níquel. Se mandaron secuenciar las variantes clonadas para comprobar que las secuencias adecuadas.

- Columnas de níquel

La purificación se realizó en columnas de níquel. Primero se purificó la variante A4 con objetivo de estandarizar la técnica.

A continuación se muestran figuras de geles de poliacrilamida al 20% realizados (debido al tamaño del fragmento VH_{1F7} fusionado a colas de histidina: 14.237KDa). Se verificó la expresión en distintos medios (LB y NZY), a diferentes temperaturas de expresión (20°C y 30°C) y la elusión de la proteína de la columna de níquel, a diferentes concentraciones de imidazol (0.1, 0.3 y 0.5 M). Éste proceso de purificación fue basado en el protocolo: *Ni-NTA Spin Kit Handbook, 01/2008, 1050188*. (Figuras 48 y 49).

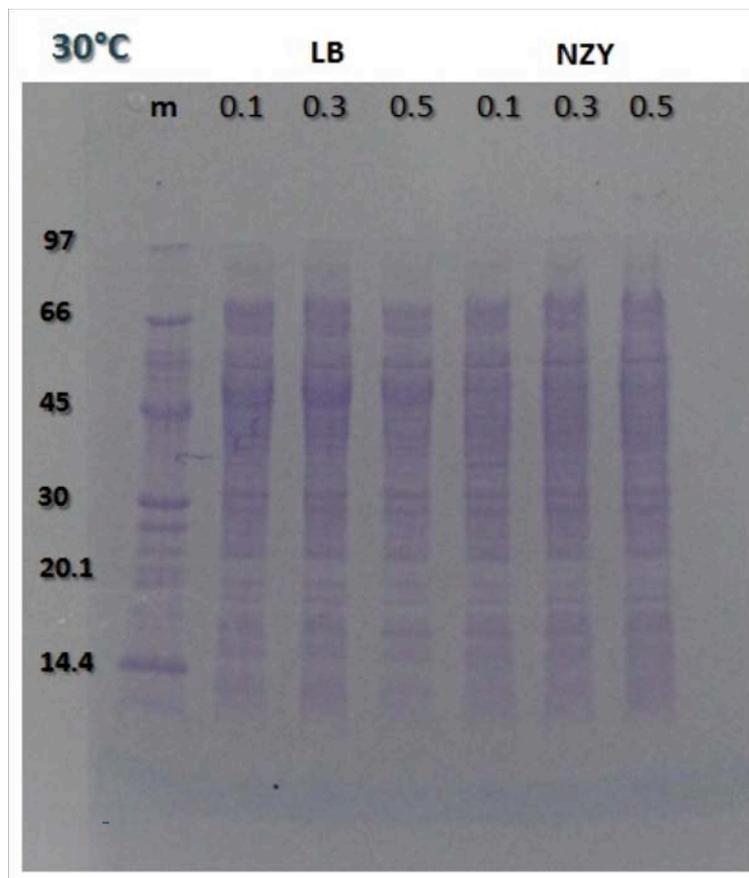


Figura 48. Gel de poliacrilamida al 20% mostrando la fracciones de la purificación del fragmento VH_{1F7}. Este ensayo fue realizado a 30°C, en diferentes medios de crecimiento (LB y NZY), y bajo diferentes concentraciones de imidazol (0.1, 0.3 y 0.5 M).

En éste caso, la banda buscada es de 14.23 kDa (fragmento VH-His). Se decidió purificar solamente este fragmento, y no en su fusión con PDH, debido a que ha sido comprobado que la proteína TyrA_{EC} presenta agregación al encontrarse fusionada en su extremo C-terminal.

Sin embargo, como se puede observar en los geles de las figuras 58 y 59, no fue posible purificar la variante A4, aún evaluando diferentes medios de expresión (LB y NZY), diferentes concentraciones de imidazol para eluir (0.1, 0.3 y 0.5 M), y diferentes temperaturas de expresión.

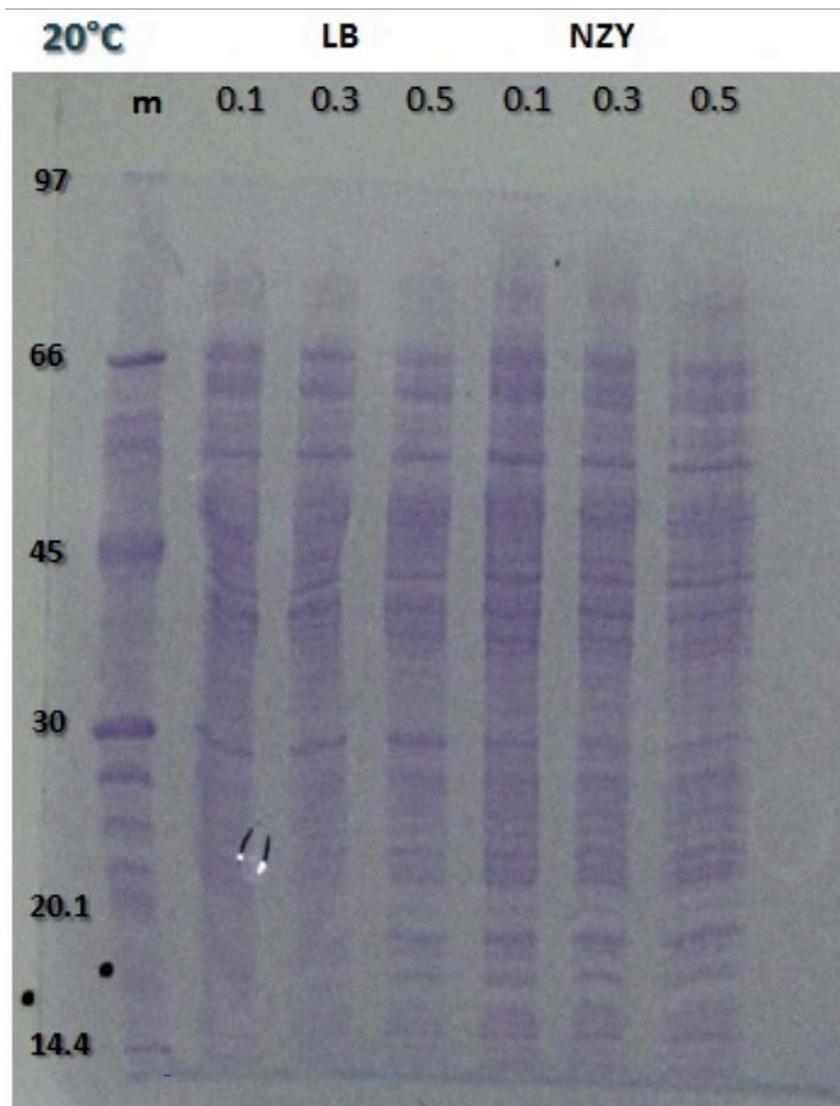


Figura 49. Gel de poliacrilamida al 20% mostrando la fracciones de la purificación del fragmento VH_{1F7}. Este ensayo fue realizado a 20°C, en diferentes medios de crecimiento (LB y NZY), y bajo diferentes concentraciones de imidazol (0.1, 0.3 y 0.5 M).

El gel de la figura 49, corresponde a la evaluación del nivel de expresión a una diferente temperatura (20°C). Como se observa, tampoco fue posible obtener la proteína (14.23 kDa).

El gel de poliacrilamida mostrado en la figura 60, se realizó con el fin de comprobar y descartar la posibilidad de que se estuviesen formando dímeros de VH_{1F7} en el proceso de purificación. Para evaluar ello se emplearon diferentes buffer para la preparación de la muestra, antes de ser sometida al proceso de electroforesis.

Los buffer utilizados difieren en la presencia del compuesto β-mercaptoetanol, un agente reductor, el cual inhibe la oxidación de los grupos tiol de los residuos de cisteína, evitando la formación de puentes disulfuro entre péptidos. De manera

que, en el buffer reductor (con β -mercaptoetanol), podría descartarse la formación de posibles dímeros purificados de VH_{1F7} , mientras que en el buffer oxidante (sin β -mercaptoetanol), se podría esperar la presencia de dichos dímeros.

Igualmente la prueba se realizó a diferentes temperaturas de expresión, eligiendo 0.3M de imidazol como concentración de elución referente y LB como medio de expresión. En la figura 50 no es posible observar la banda en el tamaño esperado.

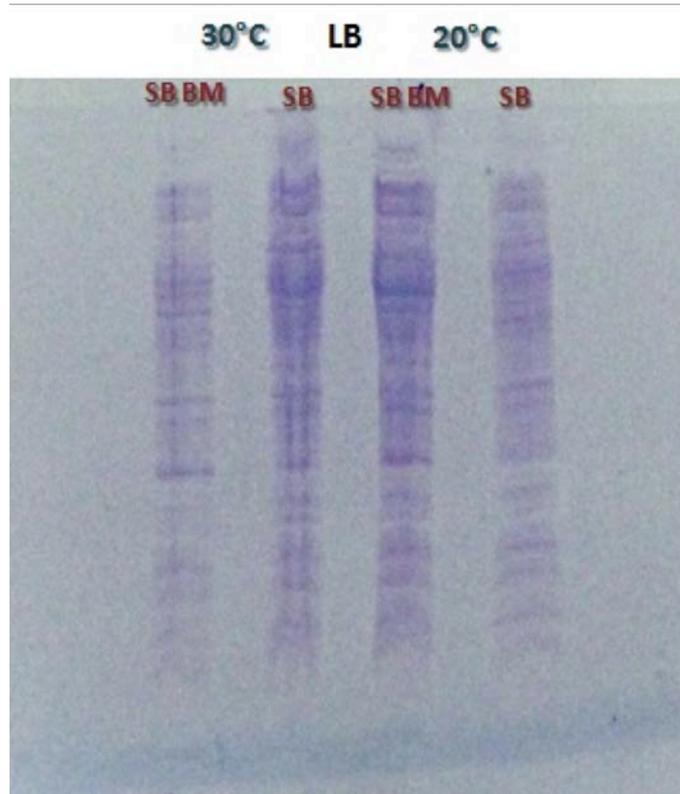


Figura 50. Efecto del β -mercaptoetanol en la migración del fragmento VH_{1F7} a ser purificado. Las primeras dos bandas indican la expresión a 30°C, con β -mercaptoetanol, y sin β -mercaptoetanol. Las últimas dos bandas indican la expresión con β -mercaptoetanol y sin β -mercaptoetanol, a 20°C como temperatura de expresión.

Como fue mostrado, se procedió con la adición de colas de histidina en el extremo carboxilo de VH_{1F7} en algunas de las variantes, con motivo de evaluar la purificación en columnas de níquel. Los resultados muestran que no fue posible obtener proteína pura de las variantes, aun probando diferentes concentraciones de imidazol. Esto puede deberse a inestabilidad estructural por parte de VH_{1F7} . Por otro lado, la introducción de colas de histidina o proteínas de fusión en el extremo carboxilo de PDH, conllevaría a una agregación [14] de la proteína de fusión VH_{1F7} -PDH, mientras que la fusión de colas de histidina en el extremo amino de VH_{1F7} , interferiría en la unión del hapteno [10] y en mediciones de actividad de corismato mutasa.

CAPÍTULO 6.

DISCUSIÓN

El método de selección utilizado en este proyecto, se basó en la aplicación de condiciones que permitieron identificar sólo aquellas variantes con características específicas. Dentro de estas condiciones se encuentran, la utilización de una cepa de *E. coli* (FA114) carente del gen *tyrA* ($TyrA_{Ec}$ - $AroQ_T$), codificante para la proteína T, que presenta actividades de pterinato deshidrogenasa ($TyrA_{Ec}$) y corismato mutasa ($AroQ_T$), de manera que la sobrevivencia de la cepa en medio sin tirosina, dependiera de la actividad de la proteína PDH ($TyrA_{Ec}$) (en selección de dímeros de VH_{1F7}) o bien, de la actividad de PDH y VH_{1F7} (en selección de dímeros VH_{1F7} con actividad catalítica).

De esta forma, la introducción de mutaciones en VH, se llevó a cabo con objetivo de mejorar la obtención de dímeros VH_{1F7} , con mayor actividad de corismato mutasa. Este proceso mutagénico se basó en la introducción de mutaciones al azar a través de todo el gene, mediante la técnica de PCR mutagénica al azar. A partir del tercer ciclo de evolución, se utilizó la técnica de DNA shuffling, con objetivo de mejorar el método de selección de mutaciones favorables, al mezclar y conservar las mutaciones seleccionadas en ciclos anteriores.

La selección de mutaciones en este proyecto, incluyó una primer selección basada en la complementación de actividad de pterinato deshidrogenasa en medio sin tirosina, de 10 variantes elegidas al azar del primer banco generado (Banco I). En este primer ciclo se seleccionaron las mutaciones: H83R y C97R, provenientes de la variante denominada 2, y V19A y Y109D, provenientes de la variante denominada 10. Estas mutaciones fueron conservadas a lo largo de los siguientes ciclos evolutivos. A partir del segundo ciclo, se modificó el proceso de selección de variantes en medio de complementación, aumentando el número de variantes a evaluar, de 10 a 96 variantes, así como el método de selección, en el cual se realizaron cinéticas de crecimiento en medio de complementación para estas 96 variantes, con una duración de 24 hrs, realizando además mediciones de actividad de pterinato deshidrogenasa ($TyrA_{Ec}$) para aquellas variantes con mejor crecimiento, así como la comparación de su secuencia.

Así mismo, este nuevo proceso de selección fue aplicado para el Banco I (utilizado en el primer ciclo de evolución, y del cual se derivaron las variantes 2 y 10), obteniendo como resultado la selección de la variante denominada A4, la cual presentó la nueva mutación K20R. Para el caso de la nueva selección aplicada para los Bancos 2 y 10, (provenientes de las primeras variantes 2 y 10), sólo fue seleccionada la mutación G103D, en el caso de la variante C11, proveniente del Banco 10, y las mutaciones: W37R, N42D y K75E, en la variante D2, proveniente del Banco 2; no presentando sin embargo, mejoras en la actividad de $TyrA_{Ec}$.

Cualquier intento posterior, no fue suficiente para mejorar la actividad de prefenato deshidrogenasa. Se llevaron a cabo cambios, por ejemplo, en el método de introducción de variabilidad, utilizando DNA shuffling a partir del tercer ciclo de evolución, en vez de mutagénesis al azar, con el fin de conservar y mezclar las mutaciones seleccionadas en las diferentes variantes, no obteniendo sin embargo una mejora en la actividad de TyrA_{EC}.

Por otro lado, el fragmento VH_{1F7} (sin mutaciones y las variantes de VH) presentó problemas de estabilidad, al no ser posible clonarlo de manera independiente a su fusión con TyrA_{EC}, además de no presentar solubilidad al evaluar su expresión en proteína total, presentando fracción soluble solamente las variantes 3(10) y 5(10). Debido a las mutaciones presentes en estas variantes, una mayor solubilidad presentada en ellas, puede deberse a la mutación Y109D.

Como es mencionado en la discusión de la figura 49, respecto a la mutación V19A, se puede observar que esta no se encuentra localizada en una posición cercana a las CDRs ni a la interface con VL. Podemos observar que Y109 se encuentra localizada justo al inicio del asa CDR H3, por lo que podríamos justificar su localización debido a las razones expuestas anteriormente (los residuos de tirosina se encuentran entre los aminoácidos localizados preferentemente en los sitios de unión a antígeno de los anticuerpos, marco teórico pag. 16), pudiendo tener una función en la catálisis de 1F7. Por otro lado, esta mutación es responsable de un cambio por un residuo de aspartato, un aminoácido cargado negativamente, lo cual conferiría solubilidad al fragmento VH al tener capacidad de interactuar con el solvente acuoso.

Respecto a la mutación H83R, este residuo de H83 no se encuentra localizado en las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) ni cerca de ellas, y dado que las CDRs son responsables de los contactos hapteno-anticuerpo, este residuo H83 no tendría interferencia en la catálisis de 1F7. Así, dado que la función de este residuo de histidina 83 no sería funcional, sino únicamente la de incrementar la solubilidad de VH, una mutación H83R sería favorable, debido a que un residuo de arginina ($pK_{a3}=12.48$), *siempre* se encontraría cargado positivamente a pH fisiológico, y tendería a localizarse siempre en la superficie en contacto con el solvente acuoso, en comparación con la flexibilidad de la histidina de encontrarse con carga positiva o neutra y pudiendo estar localizada tanto en contacto con el solvente como fuera de él. De forma que la mutación H83R, conferiría solubilidad al fragmento VH.

Por su parte, la mutación K20R (en H5) no representaría un cambio radical en solubilidad, debido a que ambos residuos: lisina y arginina, constituyen residuos cargados positivamente, capaces de interactuar con el solvente acuoso, contribuyendo de una misma forma a la solubilidad del fragmento VH.

Existe así mismo una mutación interesante, presente en las variantes: 2, 3(2) y D2, la cual es: C97R. Este residuo de cisteína 97, podría encontrarse formando un puente disulfuro, tal como se menciona en el Marco Teórico (pág. 14) con su contraparte en VL. Como es mencionado, los residuos de cisteína en las posiciones 22 y 96 en la región VH, y 23 y 88 en la región VL, forman puentes disulfuro que juegan un papel determinante en el mantenimiento de la integridad de los dominios estructurales en las regiones variables. Este residuo de cisteína pudo ser determinante para la estabilidad del dímero de VH, si se toma en cuenta que, si bien la mutación arginina (aminoácido con cadena lateral cargada positivamente a pH fisiológico) podría contribuir a la solubilidad de las variantes, estas variantes (2, 3(2) y D2), mostraron mayor fracción insoluble que soluble en geles de proteína total, además de no mostrar niveles de expresión importantes en experimentos de intensidad de fluorescencia con fusiones a GFP.

Por otra parte, el no contar con proteína pura no permitió obtener los parámetros catalíticos para las actividades de preferato deshidrogenasa y corismato mutasa, no pudiendo comparar estos valores, con los parámetros catalíticos de diversas enzimas corismato mutasa, como son mostrados en las figuras 11 y 15 del Marco Teórico.

Respecto a las estrategias alternativas para mejorar la actividad del anticuerpo catalítico 1F7, una de ellas la podría constituir el diseño racional de mutaciones en el sitio de unión al hapteno del anticuerpo 1F7. Estas mutaciones tendrían que estar orientadas a imitar las interacciones con el TSA existentes en el caso de diversas enzimas corismato mutasa, como se ilustra en las figuras 17, 18 y 19 de la sección de Marco Teórico. Así mismo en la figura 20, se ilustra una comparación de los contactos existentes con el TSA, entre 1F7 y la enzima corismato mutasa de *B. subtilis*. En esta comparación es posible observar un mayor número de interacciones electrostáticas que estabilizan el TSA en el sitio activo de BsCM, las cuales derivan en una mayor velocidad de reacción. De manera que una propuesta alternativa para mejorar la actividad catalítica del anticuerpo 1F7, la constituye el realizar un diseño racional en el sitio de unión al hapteno, de forma que pudieran incrementarse el número de contactos con el TSA. Sin embargo, la metodología de evolución dirigida, permite en cada ciclo de evolución, el probar *in vivo* las variantes seleccionadas, constituyendo una gran ventaja en comparación con las predicciones teóricas que se pudiesen realizar mediante diseño racional.

Otra estrategia para mejorar la actividad del anticuerpo catalítico 1F7, la constituye el diseñar de manera más eficiente el análogo al estado de transición de la reacción (TSA), a emplear como hapteno. La figura 10 del Marco Teórico, ilustra la molécula análogo al estado de transición de la reacción catalizada por 1F7, la cual fue sintetizada químicamente y empleada como hapteno para inducir la respuesta

inmune, a partir de la cual fue seleccionado el anticuerpo catalítico 1F7 [9]. Sin embargo, es mencionado que esta molécula utilizada como hapteno, induce la formación de un anticuerpo con un sitio de unión a hapteno carente contactos electrostáticos con el TSA (en comparación con el sitio activo de corismato mutasa), mencionando que esta molécula induce la presencia, entre otros, de un residuo de AsnH33, el cual si bien es capaz de formar un puente de hidrógeno con el grupo localizado en la posición C-4 del hapteno, es por su parte incapaz de estabilizar cargas positivas en el estado de transición de la reacción (Ver Marco Teórico pág. 24). Se propone que, si el TSA contuviera, en vez de un grupo hidroxilo, un grupo amino, en la posición C-4 (ver figura 10), este induciría la formación de un residuo de AspH33 (en vez del residuo de AsnH33 existente en el actual TSA), el cual sería capaz de estabilizar una carga positiva más en el estado de transición de la reacción, constituyendo una interacción electrostática más, y pudiendo derivar en una mayor velocidad de reacción por parte de 1F7 [10]. Sin embargo, esto constituiría todo un nuevo proceso para la obtención de inmunoglobulinas a partir de un nuevo hapteno, lo cual conlleva a su vez dificultades en la obtención y aislamiento (purificación) de inmunoglobulinas, además de las posibles complicaciones en el proceso de síntesis de un nuevo TSA.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este proyecto no fue posible mejorar la actividad catalítica del anticuerpo 1F7. La razón por la cual la estrategia empleada en este proyecto pudo no ser efectiva, puede deberse a una dificultad estructural del péptido VH_{1F7} para homodimerizar.

Se encontró que el fragmento VH_{1F7} es inestable, lo cual puede deberse a interacciones desfavorables con otras proteínas, que ocasionen que este fragmento no sea soluble y se agregue. Esta pudiera ser la razón por la cual muchas de las mutaciones seleccionadas introduzcan aminoácidos con carga, que aumenten la solubilidad de la proteína.

Una manera de mejorar la selección de mutaciones en los primeros ciclos, podría basarse en incrementar la tasa de mutagénesis a utilizar, ampliando así la probabilidad de seleccionar mutantes favorecedoras. Otra perspectiva estaría basada en iniciar los ciclos de evolución dirigida con fragmentos VH_{1F7} ya estabilizados por otros medios.

Los grupos pioneros han invertido cerca de 20 años en tratar de mejorar la catálisis del anticuerpo 1F7, sin obtener mejores resultados; esto muestra que la catálisis enzimática es un proceso muy complicado, siendo difícil mejorar la actividad catalítica... la evolución lleva mucho más tiempo trabajando en este problema que nosotros...

CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mariejoy Therese Jumawid, T.T., *Selection and structural analysis of de novo proteins from an $\alpha\beta\beta$ genetic library*. p. 226-8501.
2. Graziano JJ, L.W., Perera R, Geierstanger BH, Lesley SA, Schultz PG., *Selecting folded proteins from a library of secondary structural elements*. . J Am Chem Soc., 2008. **130**: p. 176–185.
3. Schultz P.G., L., R. , *Antibody catalysis of difficult chemical transformations*. . Acc. Chem. Res. , 1993. **26**: p. 391-395.
4. D., B., *Prediction and design of macromolecular structures and interactions*. . Phil Trans R Soc B., 2006. **361**: p. 459–463.
5. Otten, L., Quax, W., *Directed evolution: selecting today's biocatalysts*. . Biomolecular Engineering, 2005. **22** p. 1-9.
6. Hilvert, D., *Mimicking enzymes with antibodies. Artificial enzymes*, . Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2005.
7. Jensenius, J.C., Williams, A.F. , Nature, 1982. **300**: p. 583-588.
8. Blackburn, G.a.G.A., *Catalytic antibodies*.
9. Hilvert, D., Carpenter, S.H., Nared, K.D., *Catalysis of concerted reactions by antibodies: the Claisen rearrangement*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1988. **85**: p. 4953-4955.
10. Haynes, M.R., Stura, E.A., Hilvert, D., and Wilson, I.A., *Routes to catalysis: structure of a catalytic antibody and comparison with its natural counterpart*. Science, 1994. **263**: p. 646-652.
11. Wolfenden, R.a.S., Mark. , *The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts*. Acc. Chem. Res., 2001. **34**: p. 938-945.
12. Sepúlveda, J., Jin, H., Sblattero, D., Bradbury, A. and Burrone, O. , *Binders based on dimerised immunoglobulin VH domains*. J. Mol. Biol. , 2003. **333**: p. 355-365.
13. Muyldermans, S., Cambillau, C. and Wyns, L., *Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains*. . TRENDS in Biochemical Sciences, April 2001. **26**: p. 230-234.
14. Osuna, J., Flores H. and Saab-Rincón, G., *The β 1 domain of protein G can replace the chorismate mutase domain of the T-protein*. . FEBS letters, 2012. **586**: p. 466-471.

15. Chen, S., Vincent, S., and Ganem, B., *Mapping of chorismate mutase and prephenate dehydrogenase domains in the Escherichia coli T-protein.* . Eur. J. Biochem., 2003. **270**: p. 757-763.
16. Zuckerkandl, E., Pauling, L. , *Molecules as documents of evolutionary history.* J. Theor. Biol. , 1965. **8:357-366**.
17. Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., Sterner, R., and Wilmanns, M. , Science, 2000. **289**: p. 1546-1550.
18. Anantharaman, V., Aravind, L., and Koonin, E.V., Curr. Opin. Chem. Biol. , 2003. **7**: p. 12-20.
19. Hening, M., Sterner, R., Kirschner, K. and Jansonius, J.N., Biochemistry, 1997. **36**: p. 6009-6016.
20. Tuchscherer, G., Scheibler, L., Dumy, P. and Mutter, M. , Biopolymers, 1998. **47**: p. 63-73.
21. Segovia, L., y Peimbert, M. , *Ingeniería de proteínas y Evolución dirigida. Mensaje bioquímico.* . 2010. **XXXIV**: p. 135-141.
22. Sander, C., *De novo design of proteins.* . Curr. Op. Struct. Biol. , 1991. **1**: p. 630-637.
23. Hilvert, D., Taylor, S. V. and Kast, P. , *Using Evolutionary Strategies to Investigate the Structure and Function of Chorismate Mutases.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2003.
24. Stemmer, W.P., *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling.*Nature, 1994. **370**: p. 389-391.
25. Kast, P., Ullah, M. Hilvert, D. , *Exploring the active site of chorismate mutase by combinatorial mutagenesis and selection: The importance of electrostatic catalysis.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1996. **93**: p. 5043-5048.
26. Bessette, P., Aslund, F. Beckwith, J. and Georgiou, G. , *Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm.* . PNAS, 1999. **96**(24): p. 13703-13708.
27. Novonty, J., Brucoleri, R. Chotia, C., *Domain Association in immunoglobulin molecules: the packing of variable domains.* J. Mol. Biol. , 1985. **186**: p. 651-663.
28. Padlan, E., *Structural basis for the specificity of antibody-antigen reactions and structural mechanisms for the diversification of antigen-binding specificities.* Q. Rev. Biophys., 1977. **10**: p. 35-65.
29. Wade, H.a.S., T. , *The structural and functional basis of antibody catalysis.* . Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. , 1997. **26**: p. 461-493.

30. Padlan, E., Davies, D. Rudikoff, S. and Potter, M. , *Structural basis for the specificity of phosphorylcholine-binding immunoglobulins*. . *Immunochemistry*, 1976. **13**: p. 945-949.
31. Mian, S., Bradwell, A. and Olson, A., *Structure, Function and Properties of antibody binding sites*. *J. Mol. Biol.* , 1991. **217**: p. 133-151.
32. Pauling, L., *Am. Sci.* , 1948. **36**(51-58).
33. Fersht, A., *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding*. . **2**: p. 57.
34. Tramontano, A., Janda, K. Lerner, R. A. , *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986. **83**: p. 6736-6740.
35. Jencks, W.P., *Catalysis in chemistry and enzymology*. . Mc Graw Hill, 1969.
36. Hilvert, D., *Antibody catalysis of carbon-carbon bond formation and cleavage*. *Accounts Chem. Res.* , 1993. **26**: p. 391-395.
37. Begeley., J.M.T., *The Organic Chemistry of biological pathways*. . Roberts & Company Publishers. : p. 28-31.
38. Lee, A., Stewart, J., Clardy, J. and Ganem, B. , *New insight into the catalytic mechanism of chorismate mutases from structural studies*. . *Chemistry & Biology*, 1995. **2**: p. 195-203.
39. Wilson, I., Stanfield, R., *Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* , 1994. **4**: p. 857-867.
40. Chook, Y., Gray, YV., Ke, H., Lipscomb, WN., *The monofunctional chorismate mutase from Bacillus subtilis: structure determination of chorismate mutase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implication for the mechanism of the enzymatic reaction*. *J. Mol. Biol.*, 1994. **240**: p. 476-500.
41. Kast, P., Asif-Ullah M., and Hilvert, D. *Is chorismate a prototypic entropy trap? - Activation parameters for the Bacillus subtilis enzyme*. *Tetrahedron Letters*, 1996. **37**: p. 2691-2694.
42. Chiu, H., Abdubek, P., Astakhova, T., and Wilson, I., *The structure of Haemophilus influenzae prephenate dehydrogenase suggests unique features of bifunctional TyrA enzymes*. . *Structural Biology and Crystallization Communications*. , 2010: p. 1317-1325.
43. Christendant, D.a.T., J., *Identify groups involved in the binding of prephenate to prephenate dehydrogenase from Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1999. **38**: p. 4782-4793.

44. Warren, J., Walker, J., Roth, J. and Altman, E., *Construction and characterization of a highly regulable expression vector, pLAC11, and its multipurpose derivatives, pLAC22 and pLAC33*. Plasmid, 2000. **44**: p. 138-151.
45. "Una ventana al quehacer científico". Cap. 26, Evolución Experimental de Proteínas. Instituto de Biotecnología, UNAM. (2007).
46. Pastan, I., Lorimer, I. *Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNaseI in the presence of Mn²⁺*. Nucleic Acids Research, 1995, Vol. 23, No. 15. 3067-3068.
47. Gosset, G., Bolívar, F., Martínez, A., López, H., Chávez, M. *Ingeniería de vías metabólicas para la sobreproducción de L-tirosina en E. coli*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
48. Tsien, R.Y. *The green fluorescent protein*. Annu. Rev. Biochem. 1998, **67**: 509-544.
49. Stemmer, W.P. *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*. Nature, Vol. 370. 4 August, 1994.
50. Osuna, J., Flores, H., Gaytán, P. *A reporter system that discriminates EF-hand-sensor motifs from signal-modulators at the single-motif level*. FEBS Letters, **586**, (2012) 3398-3403.
51. Zhou, GW, Jincan G, Huang W. *Crystal structure of a catalytic antibody with a serine protease active site*, Science 1994, 265: 1059-1064.

ANEXOS

Cinéticas de crecimiento de A4, D2 y C11

- Cinética de crecimiento Banco I

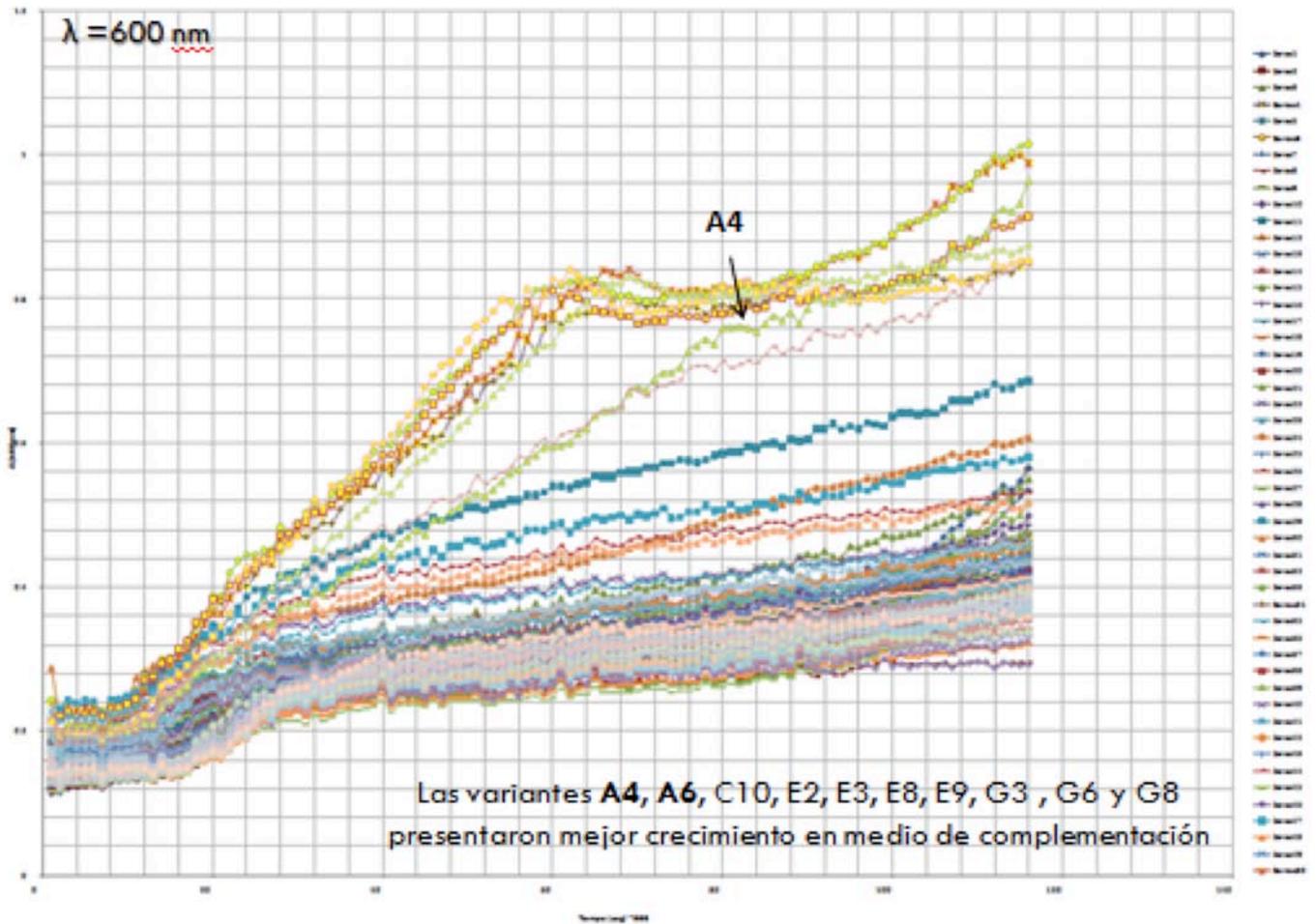


Figura 1. Cinética de crecimiento en medio de complementación del Banco I. Cepa FA114 + pACYC, a 30°C, por 24hrs, en placas de 96 pozos. (30°C)

- Cinética de crecimiento Banco 2

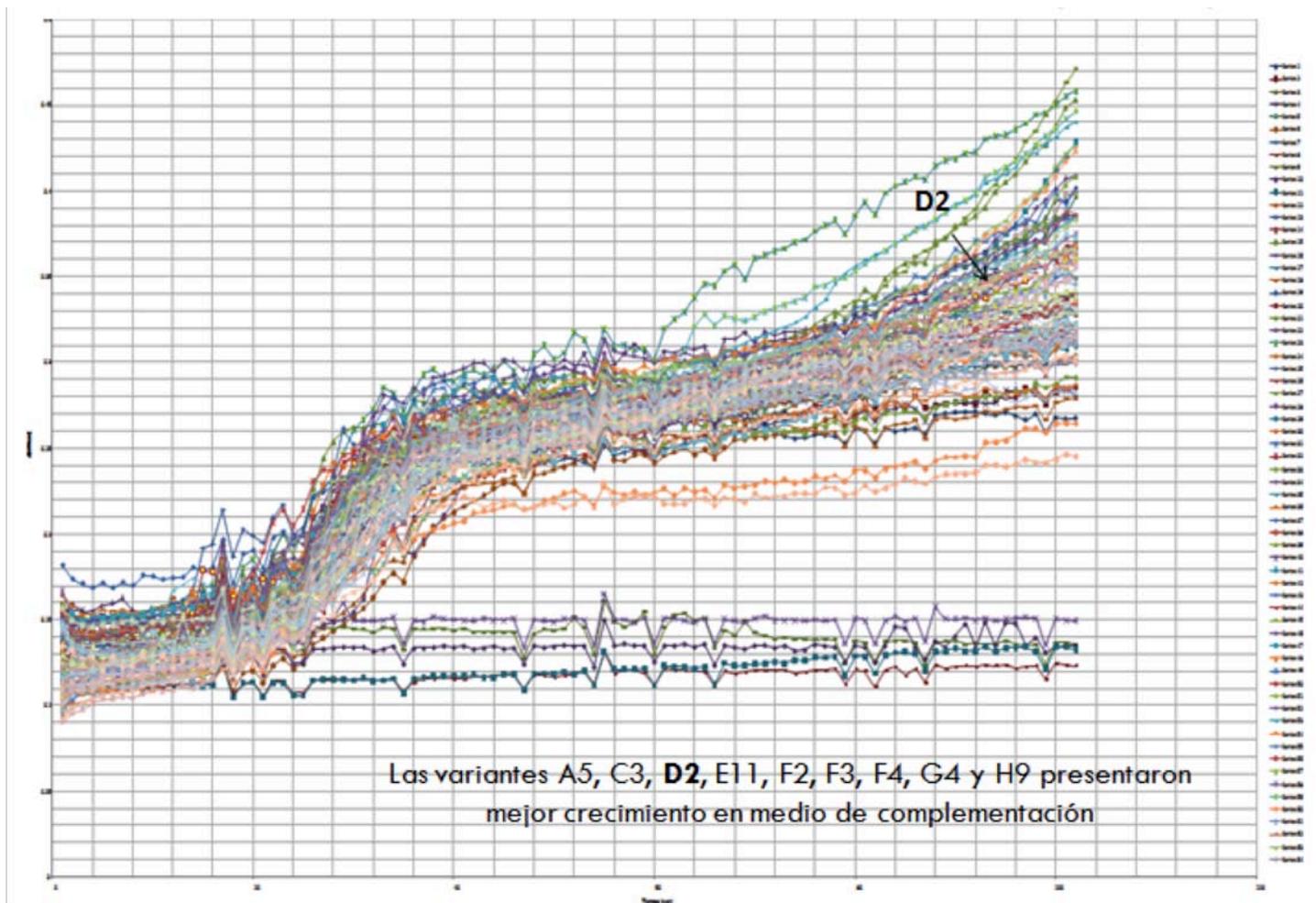


Figura 2. Cinética de crecimiento en medio de complementación, Banco 2.

- Cinética de crecimiento Banco 10

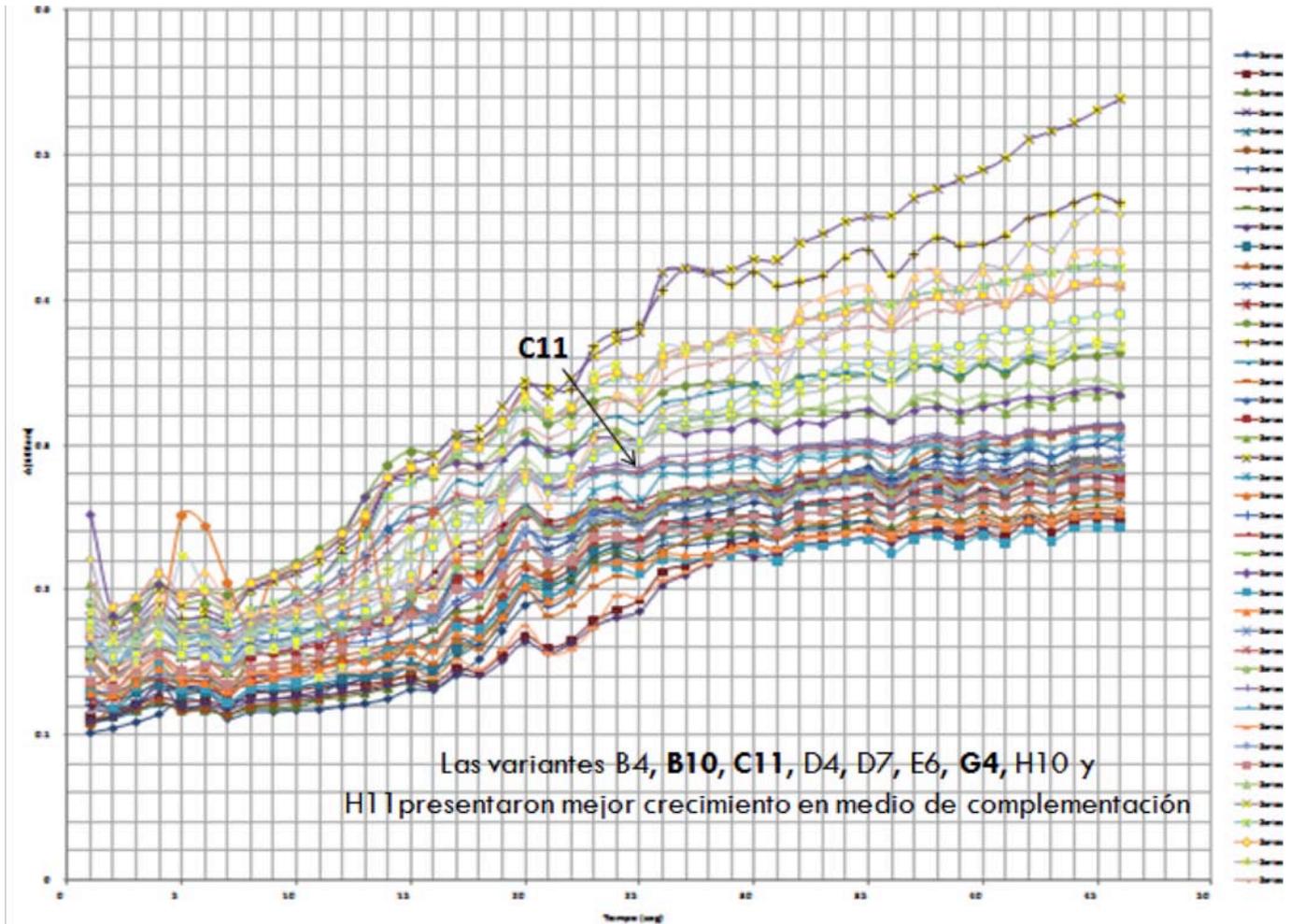


Figura 3. Cinética de crecimiento en medio de complementación, Banco 10.

Cinéticas de complementación por triplicado para actividad de PDH

Se decidió no continuar con los ciclos de evolución, y realizar por triplicado cinéticas de crecimiento, de las variantes obtenidas en los cuatro ciclos de evolución.

Los resultados se muestran en la figura 4:

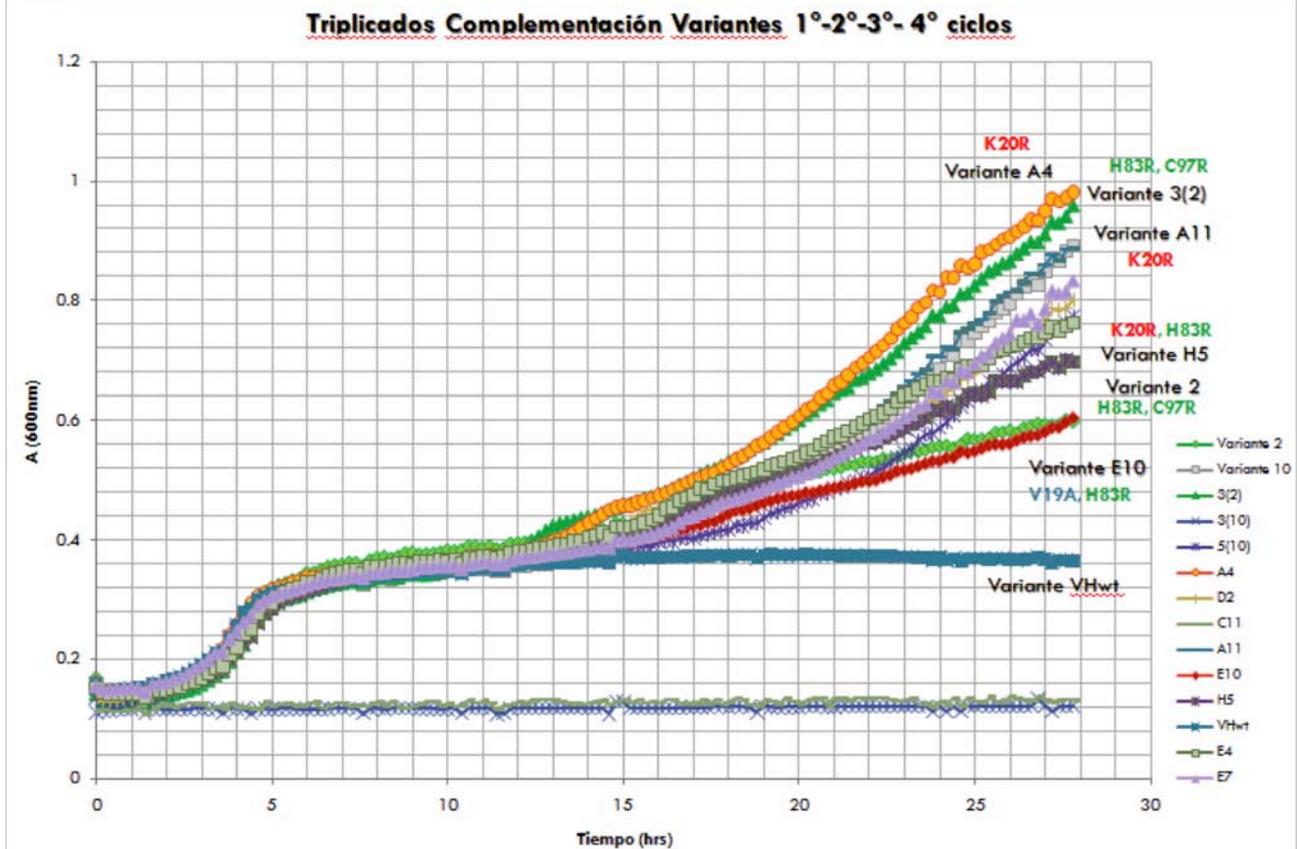


Figura 4. Experimentos por triplicado (las curvas representan el promedio de cada uno de los puntos realizados por triplicado) de las cinéticas de crecimiento en medio de complementación, de las variantes obtenidas en los cuatro ciclos de evolución dirigida. Se realizaron mediciones de densidad óptica a 600nm, y a 30°C.

La cinética presentada indica el promedio individual (puntual) de las mediciones por triplicado realizadas.

Cinética de crecimiento en medio de complementación para actividad de CM

Complementación en medio líquido

Una vez realizados estos 4 ciclos de evolución dirigida, se procedió a hacer una selección para actividad de corismato mutasa.

En la figura 5, se muestran las cinéticas de crecimiento de las variantes obtenidas en los 4 ciclos de evolución en medio de complementación a 45hrs.

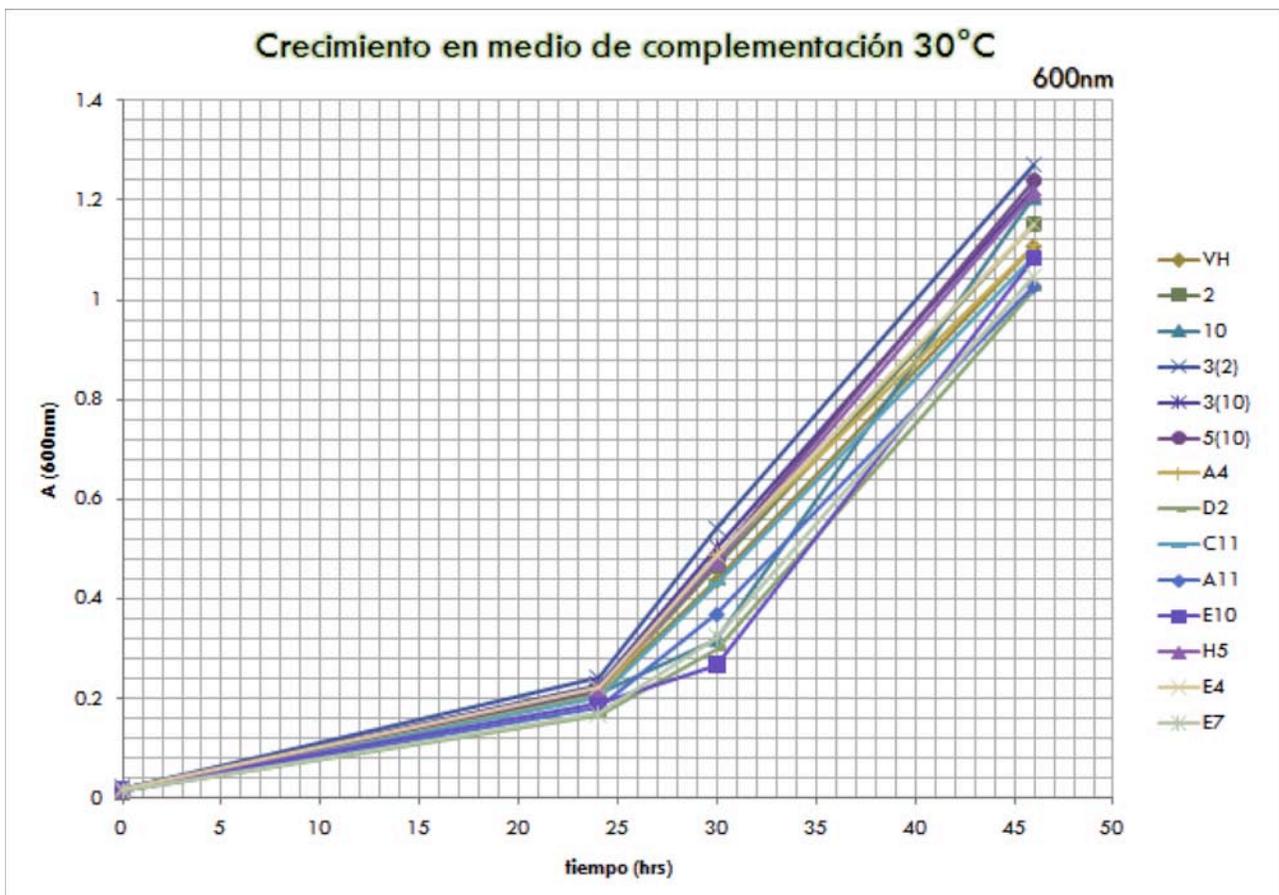


Figura 5. Cinética de crecimiento en medio de complementación, para actividad de corismato mutasa. Las variantes obtenidas en los cuatro ciclos de evolución dirigida, fueron usadas para transformar la cepa FA114 de *E. coli*, carente del gen codificante para las enzimas pefenato deshidrogenasa y corismato mutasa. Se realizaron mediciones de densidad óptica a 600nm, por 45hrs a 30°C.

Para esto se transformó la cepa FA114 de *E. coli* con las variantes, sin el plásmido accesorio pACYC, el cual contiene el gen codificante para la enzima CMPheA (dominio corismato mutasa del gen *pheA*, el cual codifica para las enzimas corismato mutasa - pefenato deshidratasa (CM-PDT), que forman parte de la ruta biosintética de la fenilalanina [47]). Así, la actividad de corismato mutasa existente, sólo proviene del fragmento VH del anticuerpo catalítico 1F7.

A partir del estudio preliminar mostrado en la figura anterior, para evaluar los tiempos a analizar, se decidió seguir el estudio a lo largo de 19 horas (Ver Anexos). En la figura 6 se muestra esta cinética de crecimiento en medio de complementación:

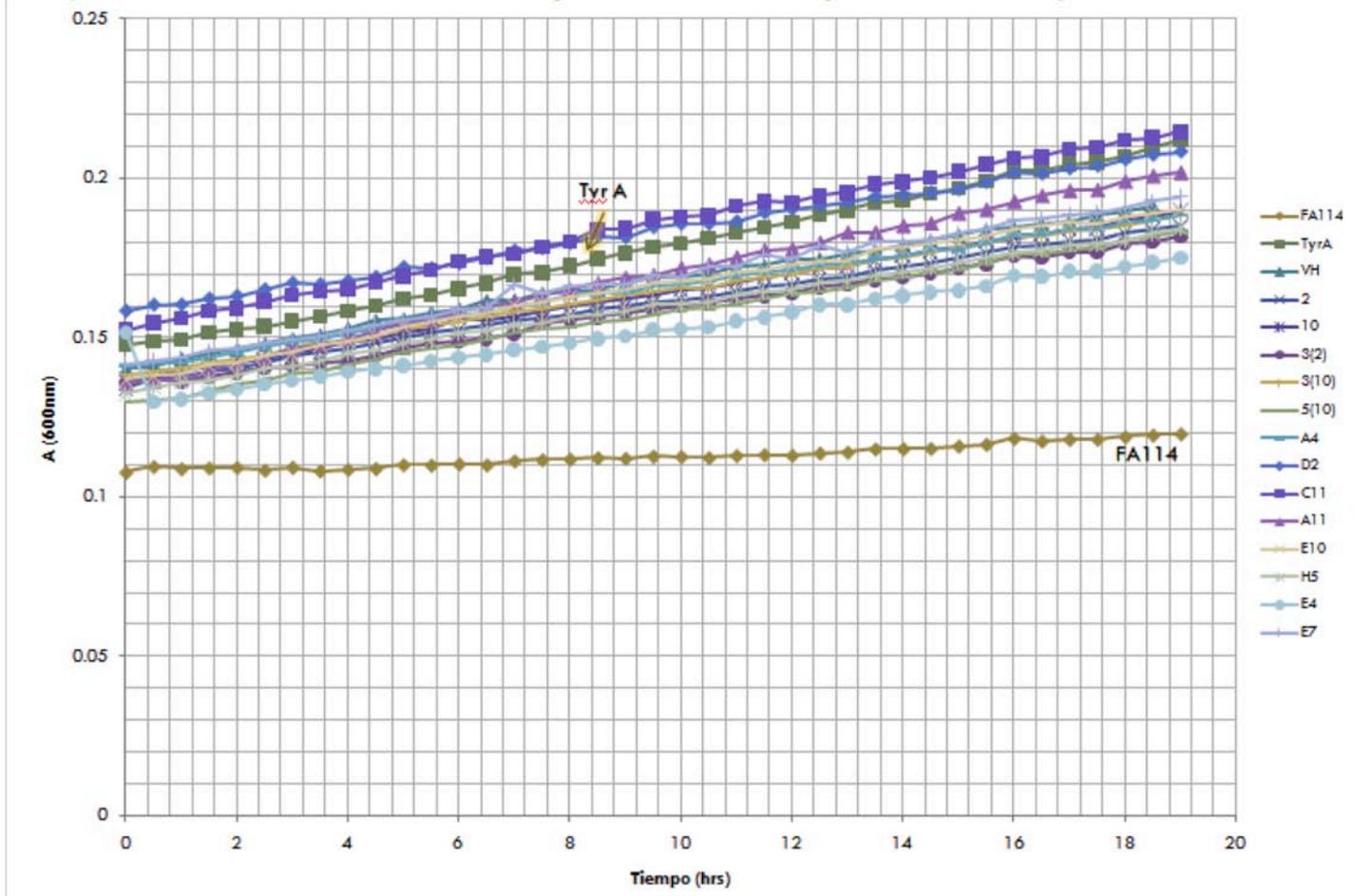


Figura 6. Triplicados de cinética de crecimiento en medio de complementación, para actividad de corismato mutasa. Las mediciones fueron llevadas a cabo a 600nm, por 19 horas.

En este caso se utilizó la variante *tyrA* ($TyrA_{Ec} - AroQ_T$) como control positivo de crecimiento en medio de complementación, y la cepa FA114 sin genes codificantes para $TyrA_{Ec}$ (pfeñato deshidrogenasa) y $AroQ_T$ (corismato mutasa), como control negativo.

Como puede observarse, el crecimiento del control negativo es significativamente menor al observado por las cepas transformadas con las variantes de VH. El control positivo *tyrA*, presenta un crecimiento comparable a estas variantes.

También se observa que, la curva del periodo evaluado de 19 horas en esta cinética, corresponde al inicio de la curva de la cinética anterior de 45 horas, lo cual hace estos triplicados comparables, a la primer curva de crecimiento.

Complementación en medio sólido

Un ensayo de complementación fue realizado posteriormente, con el fin de evaluar la actividad de la enzima corismato mutasa, comprobando el crecimiento de la cepa de selección, en medio de complementación sólido (sin tirosina), transformada con cada una de las variantes obtenidas.

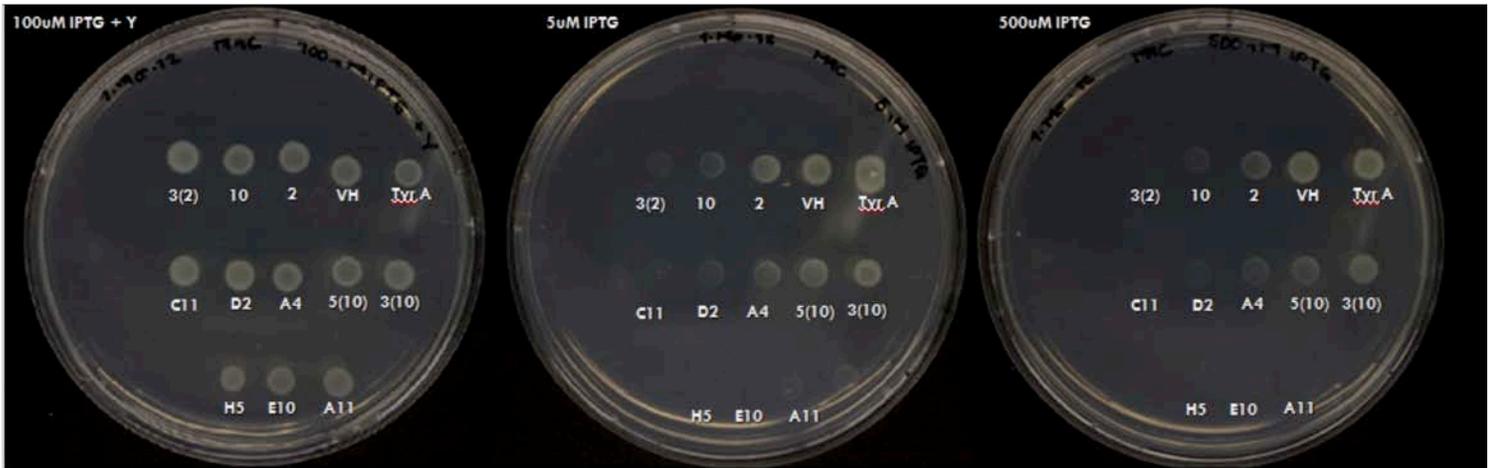


Figura 7. Ensayo de complementación en medio de selección sólido, sin tirosina. La figura muestra de izquierda a derecha: el experimento control con tirosina, utilizando 100 μ M IPTG, posteriormente, se muestran los experimentos de complementación sin tirosina, utilizando 5 μ M de IPTG y 500 μ M de IPTG. Crecimiento a 30°C.

Las características del experimento incluyen el empleo de la cepa FA114 de *E. coli* (cuyo gen codificante para la proteína T se encuentra deletado del genoma), su transformación con el vector de expresión pTrc99A, las cajas se encuentran preparadas con medio de complementación sólido (a base de sales M9), utilizando los antibióticos Km y Amp. El tiempo total de prueba fueron 8 días.

Como puede observarse, en la caja con control positivo de tirosina, se presenta un crecimiento uniforme en todas las variantes. Sin embargo, en las cajas con 5 y 500 μ M de IPTG, sin tirosina, se observa el mismo fenómeno de crecimientos uniformes, a manera de un gradiente a partir de la variante TyrA_{Ec}-AroQ_T. Ésto puede deberse, a que la tirosina producida por la variante control positivo TyrA_{Ec}-AroQ_T, pudo ayudar al crecimiento de las variantes cercanas a ella, como es el caso de VH, 5(10), 3(10), 2, A4, y 10.

Las figuras 8-13, muestran las cajas a 100 μ M de IPTG con y sin dilución, en un nuevo experimento, a 2 y 5 días de incubación:

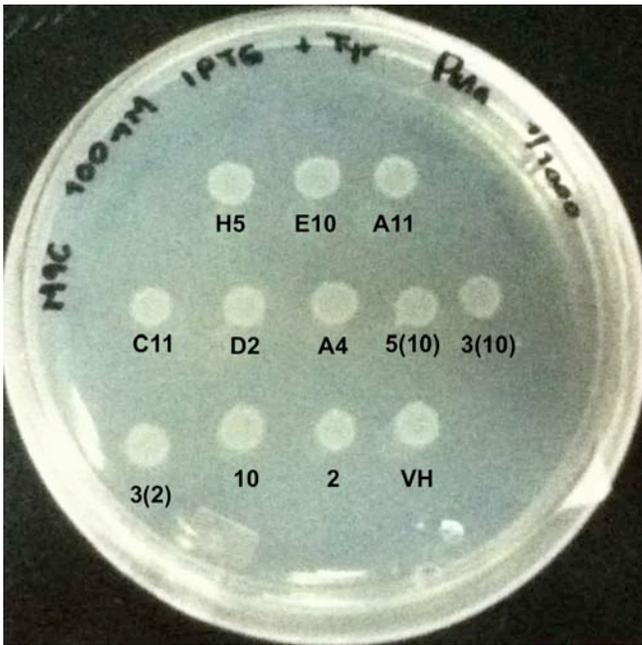


Figura 8. Crecimiento en medio de complementación sólido para actividad de corismato mutasa. Control positivo con tirosina. Dilución 1/1000, 100μM de IPTG, 30°C. (Primer repetición).



Figura 9. Crecimiento en medio de complementación sólido para actividad de corismato mutasa. Control positivo con tirosina. Sin dilución, 100μM de IPTG, 30°C. (Primer repetición).



Figura 10. Crecimiento en medio de complementación sólido para actividad de corismato mutasa. Control positivo. Se usaron gotas de cultivo, dilución 1/100. 100μM de IPTG, 30°C. 5 días



Figura 11. Crecimiento en medio de complementación sólido para actividad de corismato mutasa. Control positivo. Se usaron gotas de cultivo, sin diluir. 100μM de IPTG, 30°C. 5 días

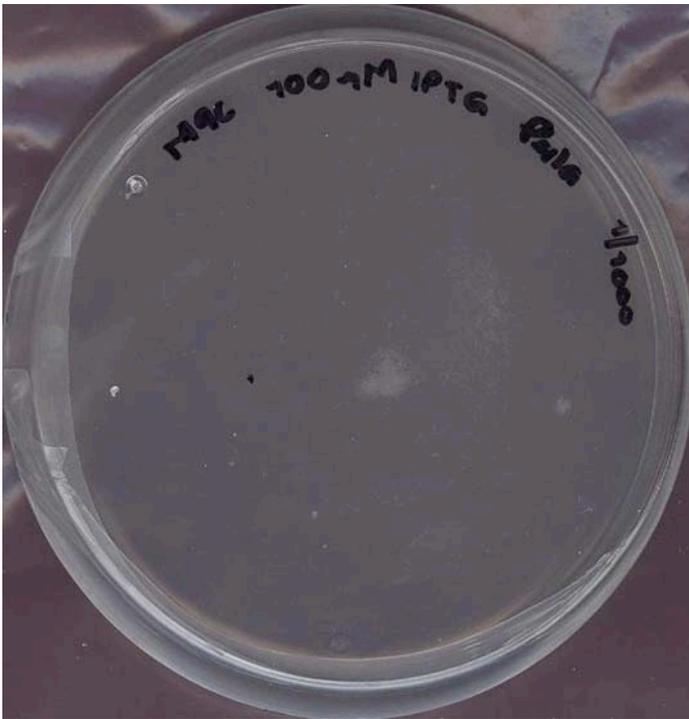


Figura 12. Crecimiento en medio de complementación sólido para actividad de corismato mutasa. Se usaron gotas de cultivo, dilución 1/1000. 100 μ M de IPTG, 30°C.

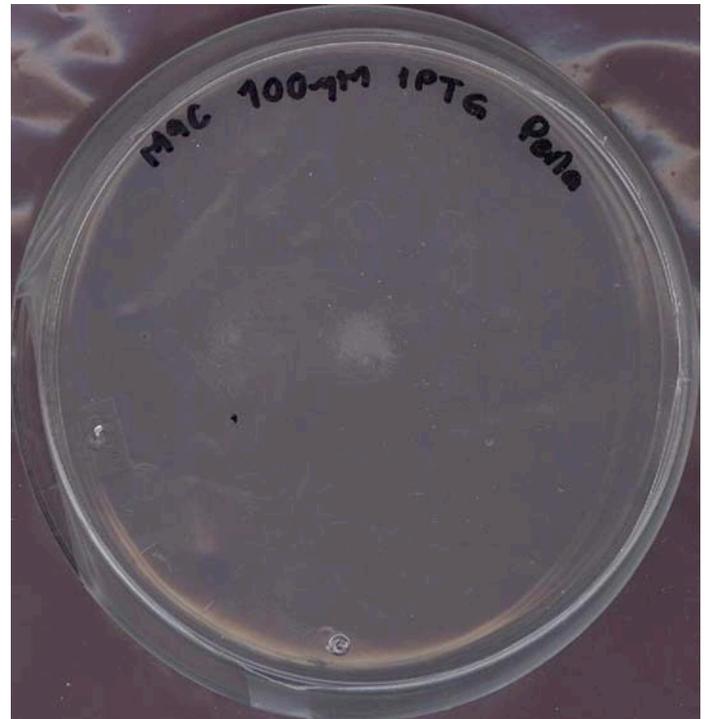


Figura 13. Crecimiento en medio de complementación para actividad de corismato mutasa. Se usaron gotas de cultivo, sin diluir. 100 μ M de IPTG, 30°C.

Ensayo de expresión 12 horas

Primeramente se realizaron ensayos de expresión de las variantes obtenidas en tres ciclos de evolución dirigida. Los datos obtenidos se muestran a continuación:

Variante	OD (600nm) 0	2 hrs	4 hrs	6 hrs	8 hrs	12 hrs
TyrA (+)	0.04	0.19	0.41	0.75	1.04	1.70
VH	0.04	0.22	0.42	0.81	1.04	1.75
2	0.04	0.20	0.40	0.74	0.97	1.59
10	0.04	0.20	0.46	0.84	1.13	1.71
3(2)	0.04	0.11	0.31	0.59	0.78	1.36
3(10)	0.04	0.18	0.48	0.84	1.08	1.79
5(10)	0.04	0.16	0.41	0.77	1.02	1.71
A4	0.04	0.19	0.42	0.75	1.01	1.62
D2	0.04	0.18	0.43	0.75	0.92	1.54
C11	0.04	0.17	0.35	0.79	0.96	1.69
A11	0.04	0.15	0.44	0.70	0.94	1.61
E10	0.04	0.21	0.39	0.82	1.19	1.83
H5	0.04	0.21	0.40	0.77	1.03	1.63

Cuadro 1. Ensayo de expresión a 30°C. Se realizaron mediciones de D.O. a 600nm. La cepa utilizada fue FA114, con el vector pTrc99A, conteniendo los genes codificantes para las variantes de VH_{1F7}, fusionados a la proteína prefenato deshidrogenasa.

Los datos mostrados en el cuadro anterior se grafican a continuación:

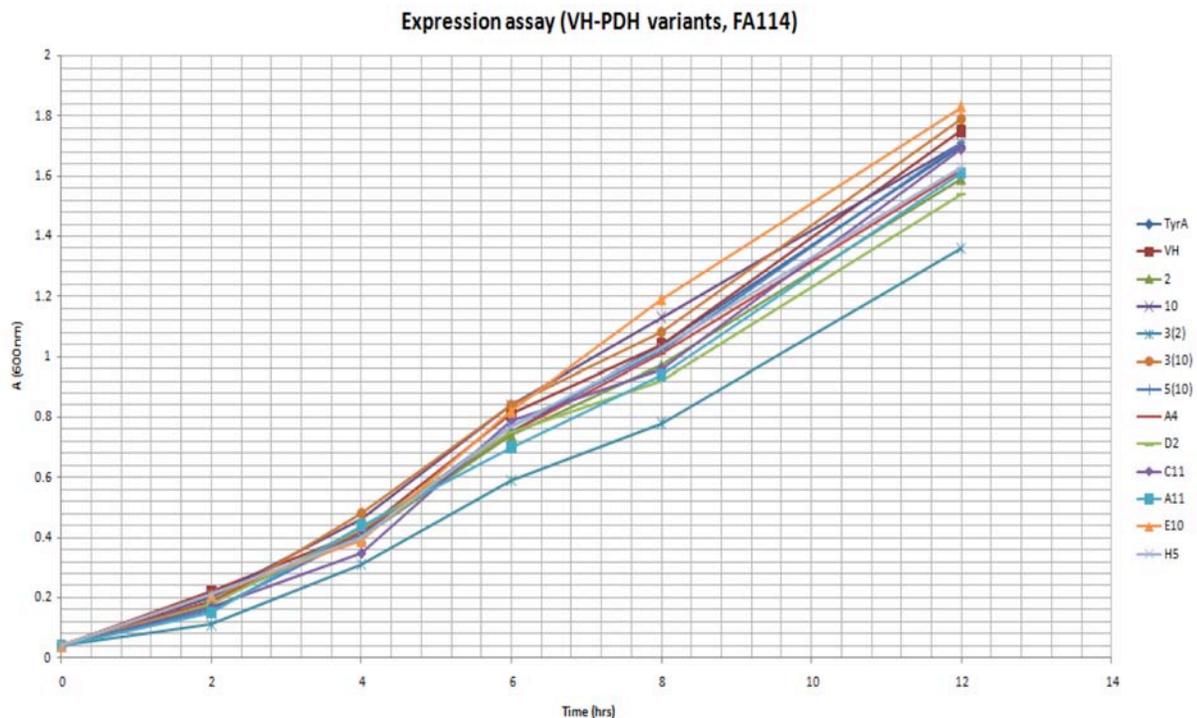


Figura 15. Gráfico de cinéticas de crecimiento a expresión, a 30°C, de las variantes obtenidas en tres ciclos de evolución dirigida. Las mediciones de densidad óptica fueron llevadas a cabo a 600nm.

Segundos ensayos de actividad de pferenato deshidrogenasa (3(2) y 5(10)).

Posteriormente se realizaron nuevos ensayos de expresión, para evaluar las actividades de pferenato deshidrogenasa, empleando como control positivo a la variante tyrA (TyrA_{Ec} - AroQ_T).

Respecto a las actividades de pferenato deshidrogenasa, los triplicados si mostraron, al igual que en las actividades anteriores, un mayor porcentaje de actividad en el caso de las variantes 3(2) y 5(10), en comparación con VH sin mutaciones.

Los resultados se muestran a continuación:

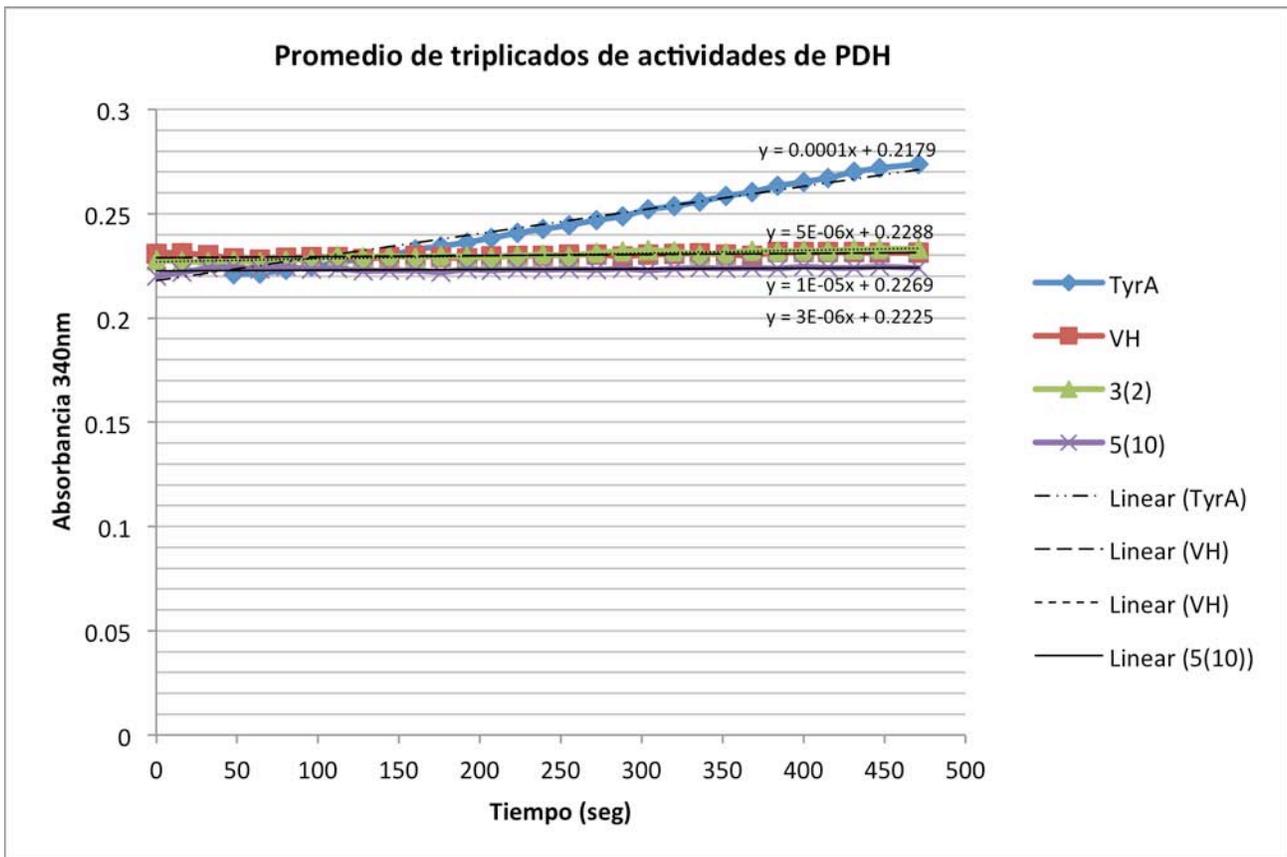


Figura 16. Cinética de actividad de PDH. Cada punto indica el promedio de los triplicados de actividad de PDH realizados, para TyrA, VH, 3(2) y 5(10).

En la figura 17, se muestra la pendiente y desviación estándar de cada curva:

Variante	Pendiente (m)	Desviación Estándar (σ)
TyrA	0.0001	0.01656
VH	5E-06	1.0757E-03
3(2)	1E-05	2.03258E-03
5(10)	3E-06	9.7889E-04

Cuadro 2. Actividad de PDH de las variantes VH, 3(2) y 5(10). Muestra datos de pendiente y desviaciones estándar.

La figura 18 ilustra las actividades relativas, calculadas en base a lo indicado anteriormente.

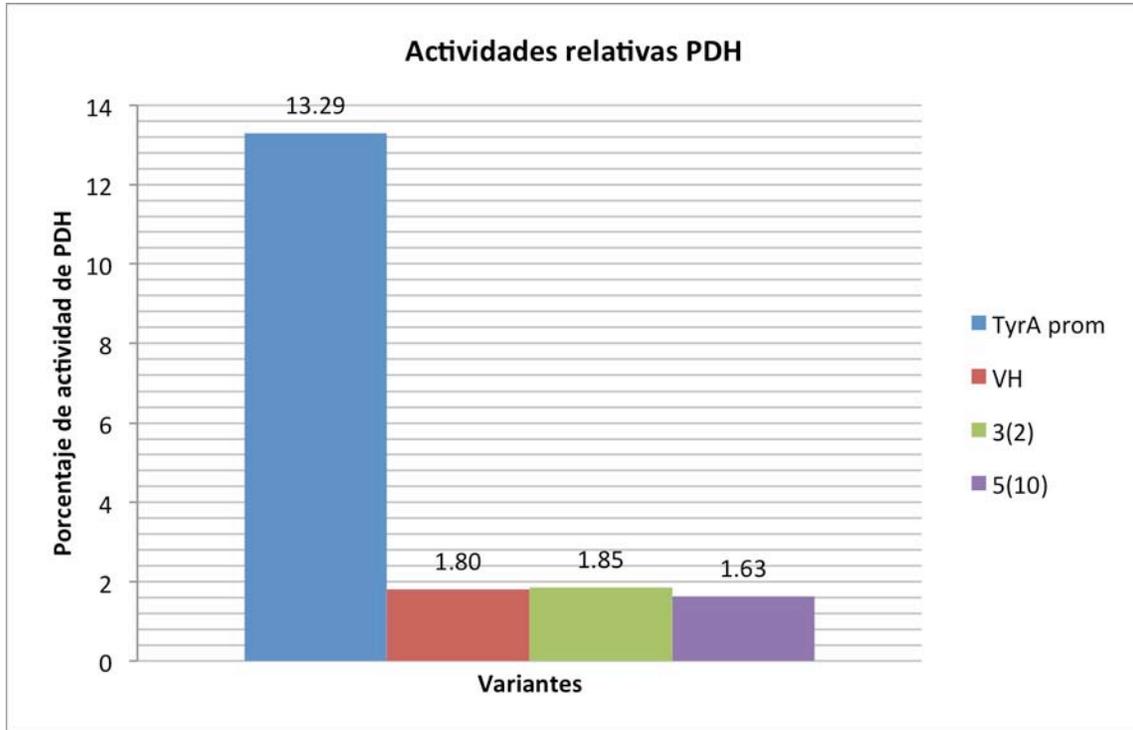


Figura 18. Actividades relativas de preferato deshidrogenasa para las variantes 3(2) y 5(10).

Ensayo 2

En la figura 19 se muestra el gráfico con los promedios de actividades obtenidas en los 3 experimentos realizados.

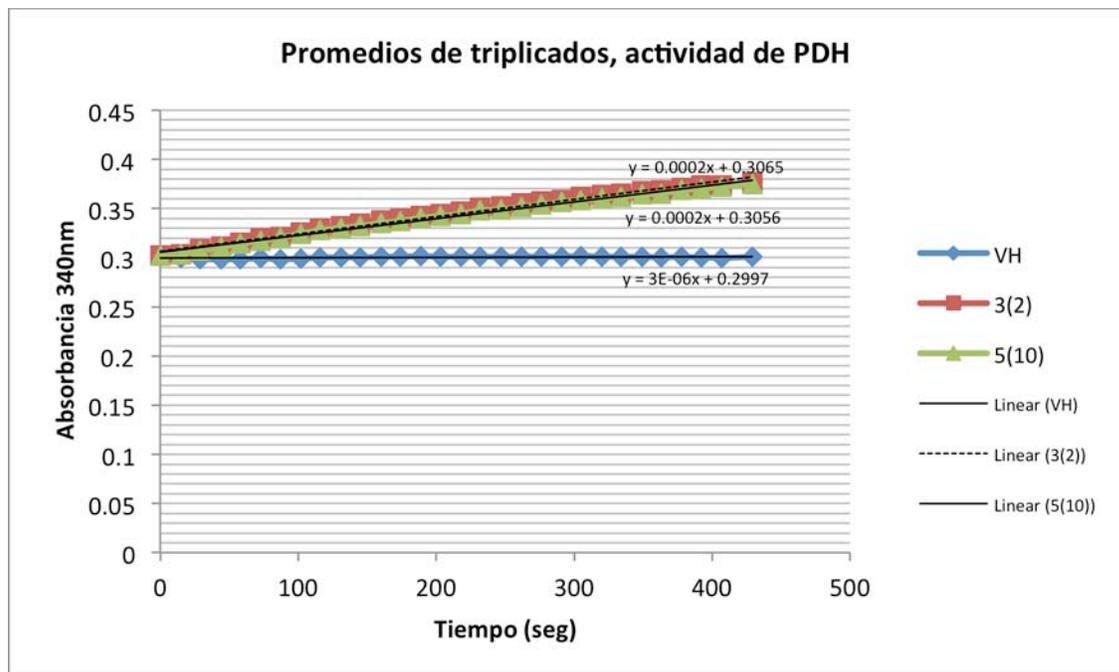


Figura 19. Actividad de PDH de VH, y las variantes 3(2) y 5(10). Cada punto indica el promedio de los tres experimentos realizados.

En la figura 20 se muestra la pendiente y la desviación estándar de cada curva (VH, 3(2) y 5(10)).

Variante	Pendiente (m)	Desviación Estándar (σ)
VH	3E-06	1.01727E-03
3(2)	2E-04	0.02275
5(10)	2E-04	0.022

Cuadro 3. Actividad de PDH de las variantes. Resultados de pendiente y desviaciones estándar en la medición de actividad con proteína soluble, de VH, y las variantes 3(2) y 5(10).

Las desviaciones estándar (σ), fueron calculadas a partir de la siguiente ecuación:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum (x_i - x(\text{prom}))^2}$$

En donde N indica el número de datos; x_i representa cada uno de los datos, desde 1 hasta N , y $x(\text{prom})$ indica la media aritmética del conjunto de datos.

En la figura 21 se muestran los resultados de actividad relativa de estos triplicados. Como se puede observar, las variantes 3(2) y 5(10), obtuvieron mejores porcentajes de actividad, en comparación con el fragmento VH (sin mutaciones).

La actividad de TyrA_{Ec} - AroQ_T (*tyrA*), fue utilizada como estándar (100%), empleando un valor de 0.4 de absorbancia (a 340nm), obtenido a partir de los resultados de actividad observados.

Actividad de *tyrA* = Absorbancia máxima observada - Absorbancia inicial

Actividad de *tyrA* = 0.6A - 0.2A, Actividad de *tyrA* = 0.4A.

El mismo procedimiento fue empleado para cada una de las variantes.

Actividad de variante = Absorbancia máxima observada - Absorbancia inicial

El cálculo de actividad relativa se realizó como sigue:

Actividad relativa = ((Absorbancia de variante)(100)) / Absorbancia de *tyrA*

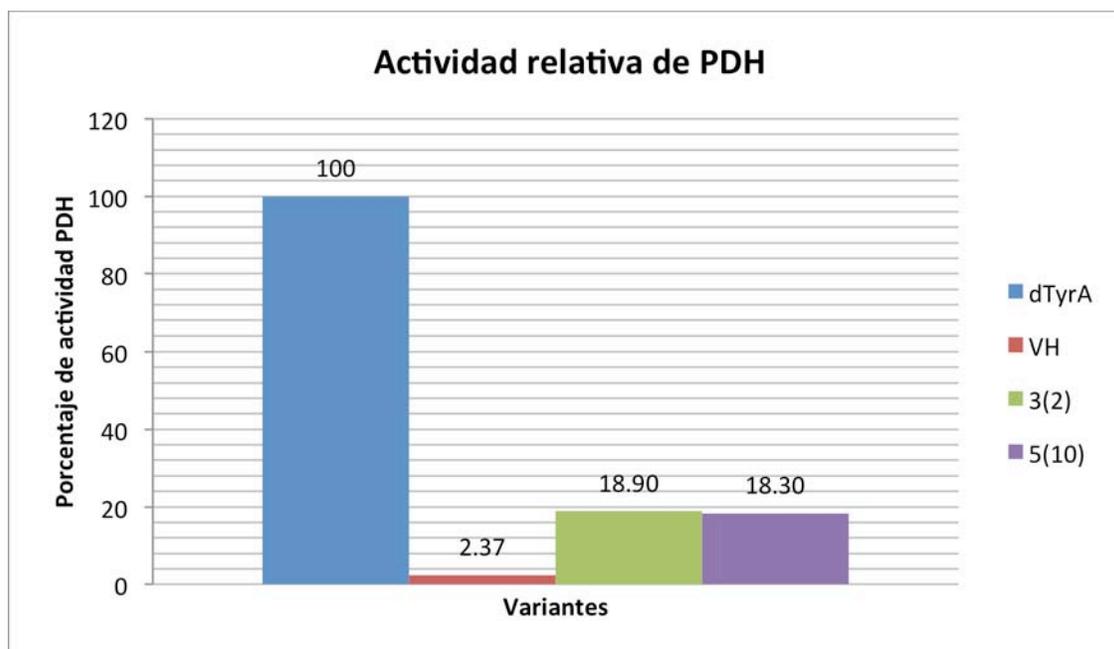


Figura 21. Actividades relativas de VH y de las variantes 3(2) y 5(10).

Así mismo, se realizaron segundos ensayos de actividad de prefenato deshidrogenasa para estas dos variantes, además de ensayos de actividad de corismato mutasa, incluyendo el control positivo *tyrA* ($TyrA_{Ec}$ - $AroQ_T$) (Véase Anexos).

Triplicados de actividades de corismato mutasa, cepa de selección FA114

Actividades de corismato mutasa:

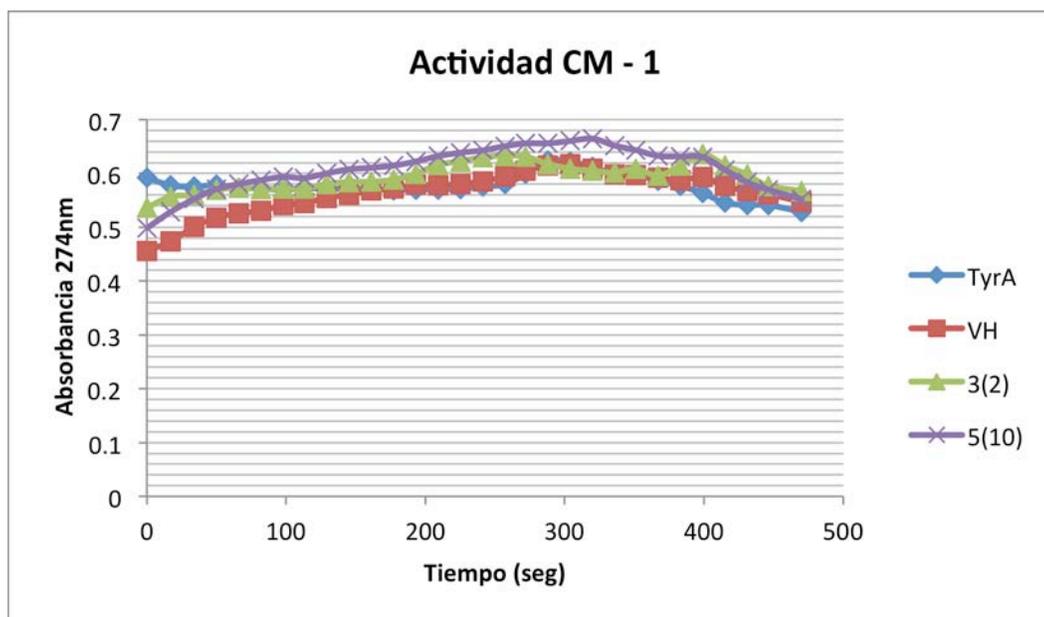


Figura 22. Actividades de corismato mutasa, evaluadas en base a extractos solubles de proteína total, en experimentos de expresión en 15ml. Se realizaron registros de la desaparición de corismato, a 274nm. (Primer repetición)

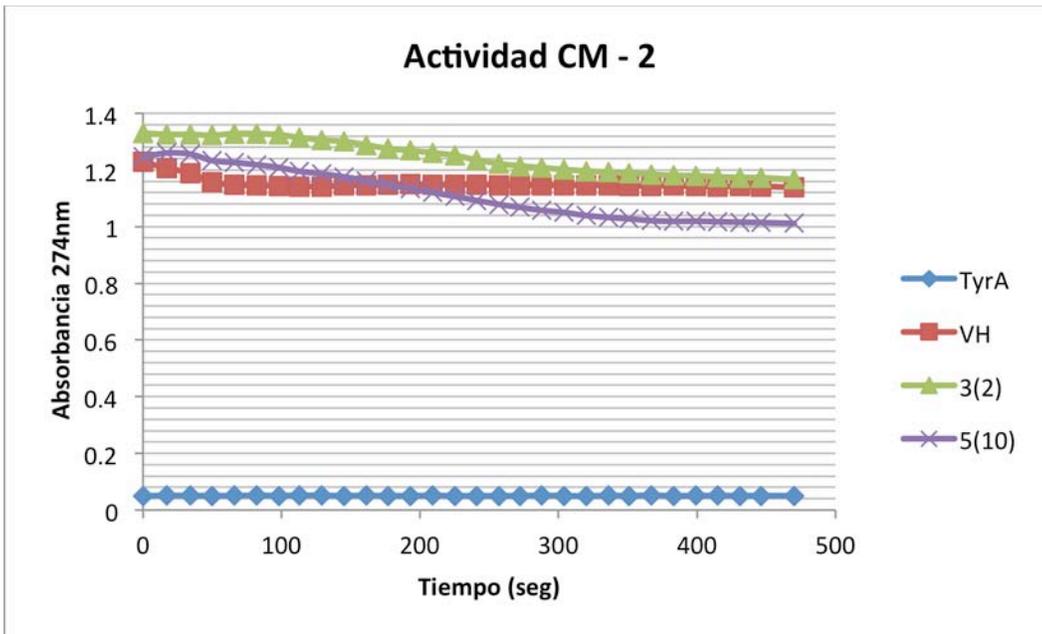


Figura 23. Actividades de corismato mutasa, evaluadas en base a extractos solubles de proteína total, en experimentos de expresión en 15ml. Se realizaron registros de la desaparición de corismato, a 274nm. (Segunda repetición)

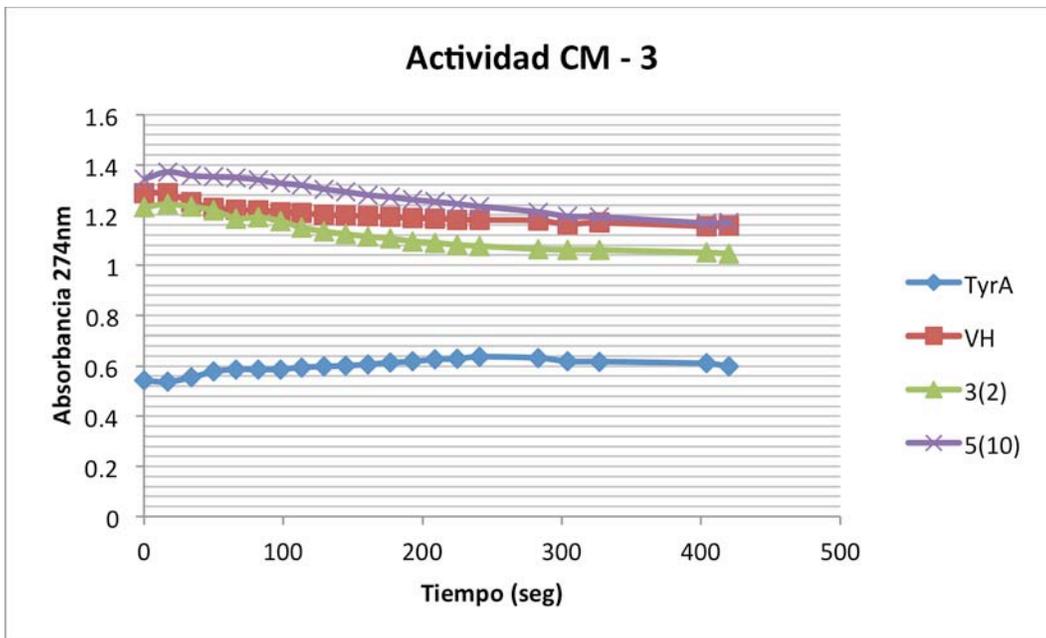


Figura 24. Actividades de corismato mutasa, evaluadas en base a extractos solubles de proteína total, en experimentos de expresión en 15ml. Se realizaron registros de la desaparición de corismato, a 274nm. (Tercera repetición)

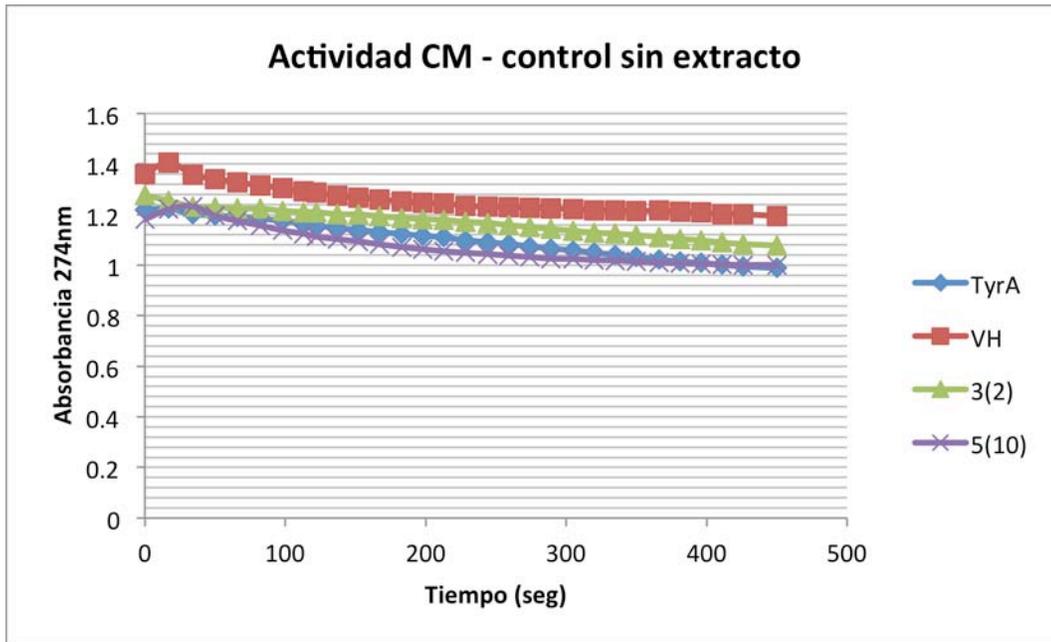


Figura 25. Actividades de corismato mutasa, evaluadas en base a extractos solubles de proteína total, en experimentos de expresión en 15ml. Se realizaron registros de la desaparición de corismato, a 274nm. (Control negativo, sin extracto en la reacción)

Características de la reacción (mediciones de actividad de corismato mutasa):

SAFIRE, Instrument serial number: 129011300282, Measurement mode: Absorbance, Measurement wavelength: 274nm, Number of flashes: 10, Plate definition file: COS6ft.pdf, Part of the plate: D9-D12, Number of kinetic cycles: 30,