



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CONSTRUCCIÓN DE QUIMERAS DE PROTEÍNAS CON PLEGAMIENTO DE BARRIL

TIM

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
LBM TOMÁS FRANCISCO MAYA MALERVA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. GLORIA SAAB RINCÓN
[INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. LORENZO PATRICK SEGOVIA FORCELLA
[INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA](#)

DR. ADRIÁN OCHOA LEYVA
[INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA](#)

Cuernavaca, Morelos. Marzo, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Gloria Saab Rincón, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, campus Morelos de la Universidad Nacional Autónoma de México, contado con los apoyos económicos del proyecto PAPIITUNAM (IN211020) y la beca CONACyT para la obtención del grado de Maestro.

AGRADECIMIENTOS

Académicos

A mi asesora la Dra. Gloria Saab Rincón, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, compartir sus conocimientos y siempre estar dispuesta a resolver mis dudas.

A la Ing. Leticia Olvera, por su paciencia al apoyarme en el trabajo experimental.

Al Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella y Dr. Adrián Ochoa Leyva por formar parte de mi comité tutorial y enriquecer el proyecto con sus opiniones y puntos de vista.

A los miembros del jurado del examen de Maestría:

Presidente: Dr. Agustín López Munguía Canales

Vocal: Dr. Alejandro Ángel García Rubio Granados

Vocal: Dra. Georgina Garza Ramos

Vocal: Dr. Armando Hernández García

Secretario: Dr. Enrique Rudiño Piñera

Personales

A mi madre Tomasa, gracias por confiar en mí y apoyarme en cada decisión que he tomado. Mis logros son los tuyos también.

A mi tía Josefina, gracias por todo su apoyo y gracias por tratarme como un hijo.

A mis hermanos Lalo y Rigo y a mis primos Luis y Brenda, por el cariño que me tienen.

A Brenda Uribe, gracias por el apoyo emocional.

Ami madre

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Estructura del plegamiento ($\beta\alpha$) ₈	12
1.2. Evolución del plegamiento del barril (β/α) ₈	13
1.3. Triosafofato isomerasa (TIM).....	15
1.3.1. Estructura de la Triosafofato Isomerasa	15
1.3.2. Mecanismo catalítico de TIM.....	16
1.3.3. Monómero TIM de Trypanosoma brucei	16
1.4. Fosforibosil antranilato isomerasa (PRAI)	18
1.4.1. Estructura de la Fosforibosil antranilato isomerasa	18
1.4.2. Mecanismo catalítico de PRAI	19
2. ANTECEDENTES	20
2.1. Permutación circular	21
2.2. Permutación circular azarosa de TIM y PRAI	23
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo General.....	25
4.2. Objetivos Particulares.....	25
5. MÉTODO	25
5.1. Selección de los fragmentos con plegamiento autónomo para la construcción de las quimeras	25
5.2. Diseño de oligonucleótidos y construcción de los genes quiméricos.....	26
5.3. Clonación de los genes quimera.....	27
5.4. Selección de las variantes solubles.....	29
5.5. Expresión heteróloga	29
5.6. Recuperación de proteínas de cuerpos de inclusión.....	29
5.7. Purificación de las proteínas quimera.....	30
5.8. Desplegamiento/replegamiento térmico	30
5.9. Desplegamiento con urea	31
5.10. Complementación de la actividad triosa fosfato isomerasa	33

6. RESULTADOS	33
6.1. Clonación del gen yPRAI	33
6.2. Identificación de los sitios que delimitan subunidades de plegamiento en posiciones equivalentes entre las proteínas TIM y PRAI	34
6.3. Construcción de la proteína quimera con interfase en el asa $\alpha_2\beta_3$ Quimera asa $\alpha_2\beta_3$ MonoTIM5'/PRAI3'	35
6.3.1. Generación de la quimera mediante PCR por extensión de regiones sobrelapadas	36
6.3.2. Quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' (PaMc $\alpha_2\beta_3$)	38
6.4. Expresión y purificación de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' PaMc $\alpha_2\beta_3$	42
6.5. Caracterización de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' variante GH	44
6.5.1. Desplegamiento térmico	46
6.5.2. Desplegamiento con Urea	46
6.5.3. Ensayo de complementación de la actividad triosafosfato isomerasa	49
7. DISCUSIÓN	50
8. CONCLUSIONES	52
9. PERSPECTIVAS	53
10. REFERENCIAS	54
11. ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Página
Figura 1. Amplitud taxonómica del plegamiento de barril ($\beta\alpha$) ₈	11
Figura 2. Plegamiento de barril ($\beta\alpha$) ₈ de TbTIM	12
Figura 3. Modelo de la evolución de la estructura de barril	14
Figura 4. Interconversión de DHAP a GAP	16
Figura 5. Estructura de la enzima TIM de <i>T. brucei</i> y su variante monomérica	17
Figura 6. Estructura del complejo bifuncional IGPS:PRAI	18
Figura 7. Isomerización de PRA a CdRP	19
Figura 8. Diagrama de permutación circular	23
Figura 9. Distribución de los nuevos inicios amino terminales en las estructuras secundarias de MonoTIM yPRAI	24
Figura 10. Estrategia de construcción y selección de las secuencias quiméricas.	28
Figura 11. Clonación del gen yPRAI	34
Figura 12. Alineamiento estructural de TbMonoTIM y ePRAI	35
Figura 13. Gel electroforético de la construcción de la quimera MaPc	36
Figura 14. Cultivos de las células transformantes MaPc en el medio de selección	37
Figura 15. Secuenciación de las probables quimeras	38
Figura 16. Gel electroforético de la de la construcción de la quimera PaMc	39
Figura 17. Cultivos de las células transformantes PaMc en el medio de selección	40
Figura 18. Corrimiento electroforético de PCR de colonia	40
Figura 19. Selección de colonias en LB/Cm	41
Figura 20. Alineamiento múltiple de las quimeras con respecto a la secuencia original PaMc	42
Figura 21. SDS-PAGE de la expresión de tres variantes de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3'	43
Figura 22. SDS-PAGE de la quimera RS en la cepa ER de <i>E. coli</i>	43
Figura 23. SDS-PAGE de la purificación de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' variante GH	44
Figura 24. Espectro de CD de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' variante GH, MonoTIM y yPRAI	45
Figura 25. Estabilidad térmica de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' GH	46
Figura 26. Estabilidad en urea de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' GH. Mdeg vs [Urea]	47
Figura 27. Estabilidad en urea de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' GH. Fapp vs [Urea]	48
Figura 28. Complementación de actividad triosa fosfato isomerasa en la cepa auxótrofa <i>E. coli</i> ER Δ Tpi	50

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grado Celsius
λ	Longitud de onda
μ L	Microlitro
μ m	Micrómetro
Abs	Absorbancia
Ap	Ampicilina
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
CCW	Sentido contrario a las manecillas del reloj
CdRP	Carboxifenilamino
Cm	Cloranfenicol
CW	Sentido de las manecillas del reloj
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTT	Ditiotreitol
EC	Comisión de enzimas (Enzyme comision)
Fapp	Fraction unfolded protein
g	Gramo
GAP	D-gliceraldehído-3-fosfato
h	Horas
IGP	Indol-3-glicerol-fosfato
IGPS	Indol-glicerol fosfato sintasa
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM9	Medio mínimo M9
Nm	nanómetros
PaMc	Quimera construida con la región 5' de yPrai y 3' de MonoTIM
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pb	Pares de bases
PDB	Protein Data Bank
PRA	Aminoaldolasa-N-(5'fosforibosil)-antranilato
PRAI	Fosforil antranilato isomerasa
RBS	Sitio de unión a ribosoma
RPM	Revoluciones por minuto
TbMonoTIM	TIM monomérica de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>
TbTIM	TIM de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>
TIM	Triosafofosfato isomerasa
Tm	Temperatura media de fusión
Wt	Tipo silvestre
yPRAI	Fosforibosil antranilato isomerasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

RESUMEN

Actualmente se han determinado una gran variedad de topologías presentes en las proteínas, sin embargo, muchas de ellas presentan subdominios o unidades estructurales más pequeñas que muestran un alto grado de similitud tanto en secuencia como en estructura, por ello, se ha propuesto que algunos dominios proteicos tienen un origen evolutivo común mediante duplicación, recombinación o extensión de genes que codificaban para subdominios estables. Asimismo, la gran diversidad de actividades catalíticas relacionada a una misma topología nos permite proponer la evolución de enzimas mediante la modificación de sitios activos en andamios evolutivamente maleables. Debido a la ubicuidad del plegamiento de barril ($\beta\alpha$)₈, su estructura modular repetitiva y la diversidad de actividades catalíticas que esta topología presenta, diversos grupos de trabajo la han tomado como un excelente modelo de estudio. Se ha propuesto que el plegamiento del barril surgió de la duplicación de subdominios ($\beta\alpha$)_{2n} estables que finalmente divergieron en secuencia, explorando diversas funciones con ello.

Bajo la hipótesis de que las proteínas actuales derivan de fragmentos más pequeños, específicamente en el barril ($\beta\alpha$)₈, se utilizaron las enzimas TIM y yPRAI, las cuales comparten estructura, pero no identidad de secuencia. Tomando como referencia los módulos con plegamiento independiente determinados en las enzimas TIM y PRAI por Damián-Almazo se construyeron cinco proteínas quimeras utilizando la región N-terminal de PRAI y C-terminal de TIM con el punto de intersección en las regiones identificadas en el mapeo. La librería construida se subclonó en un vector que agrega un reportero de plegamiento en la región C-t de la quimera que serviría como método de selección. Finalmente, se seleccionó una sola variante para expresar y seguir con la caracterización fisicoquímica. Se determinó que la proteína quimera GH presenta plegamiento en presencia y ausencia de CAT. Asimismo en desplegamiento térmico se observa plegamiento cooperativo, así como un probable intermediario en el desplegamiento con urea, debido posiblemente a que la interfase que une ambos subdominios no está optimizada.

1. INTRODUCCIÓN

Una gran variedad de proteínas topológicamente distintas presentan unidades estructurales pequeñas o subdominios que muestran un alto grado de similitud de secuencia y homología en su estructura, por lo que se ha propuesto la hipótesis de que los dominios proteicos evolucionaron mediante duplicación, recombinación o extensión de esos subdominios estables (**Bogarad y Deem, 1999; Söding y Lupas, 2003**) diversificando la arquitectura del dominio y produciendo plegamientos novedosos (**Söding y Lupas, 2003; Tomii et al., 2012**) como lo han reportado anteriormente con la construcción de proteínas plegadas que han sido ensambladas a partir de motivos repetitivos (**Nikkhah et al., 2006; Yadid y Tawfik, 2007; Broom et al., 2012**) o extendiendo un motivo central (**Watanabe et al., 2014**).

La duplicación de los genes tiene un rol importante en la evolución de las enzimas, ya que aproximadamente el 50% de todos los genes de microorganismos son resultado de eventos de duplicación, seguido de la diversificación de los genes duplicados (**Fani et al., 1998; Lynch y Conery, 2000**). Por ello y debido a la ubicuidad de proteínas con plegamiento de barril TIM (**Fig. 1**), la duplicación frecuente de este gen es una conjetura lógica que la hace, junto con su estructura modular y repetitiva, un excelente modelo para el estudio de la evolución del plegamiento de proteínas.

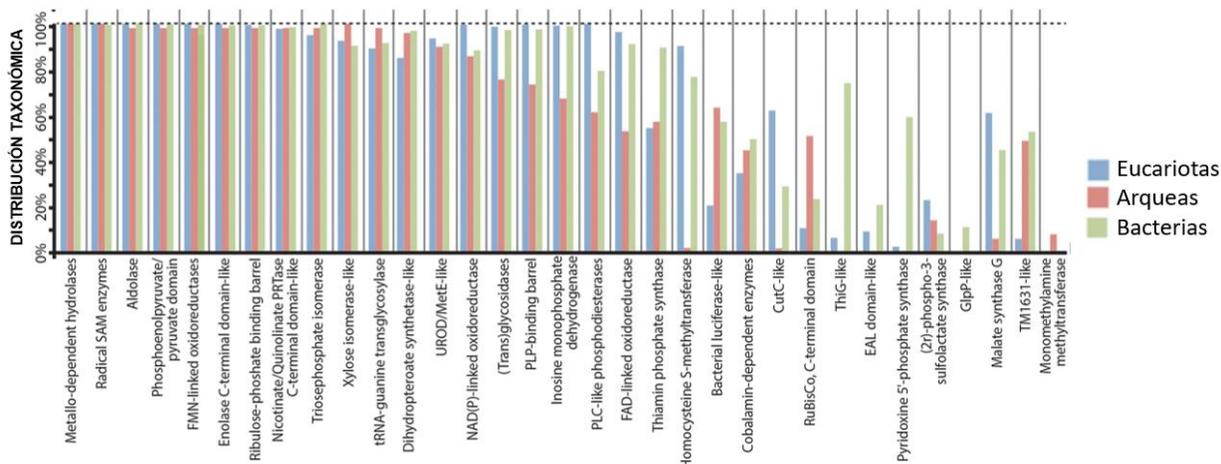


Fig.1. Amplitud taxonómica del plegamiento de barril ($\beta\alpha)_3$ en los tres dominios de la vida. Modificado de Goldman *et al.*, 2015.

1.1. Estructura del plegamiento ($\beta\alpha$)₈

La estructura canónica del plegamiento de barril TIM está constituida por ocho repeticiones de hebra β y hélice α (β/α)₈. La unidad básica la conforma una hebra β y una hélice α , unidas entre ellas mediante un asa $\beta\alpha$ ubicada en la parte superior del barril (cara catalítica). Por otro lado, las unidades individuales ($\beta\alpha$) están unidas entre ellas por asas $\alpha\beta$ que se localizan en la parte inferior de la estructura del barril (cara de estabilidad). En la parte interna del barril las hebras β se posicionan paralelamente formando un anillo, que es estabilizado mediante puentes de hidrógeno y que es rodeado por ocho hélices α (**Fig. 2**). El sitio activo de las enzimas con plegamiento (β/α)₈ se localiza en las posiciones carboxilo terminal, así como en las asas $\beta\alpha$ proximas.

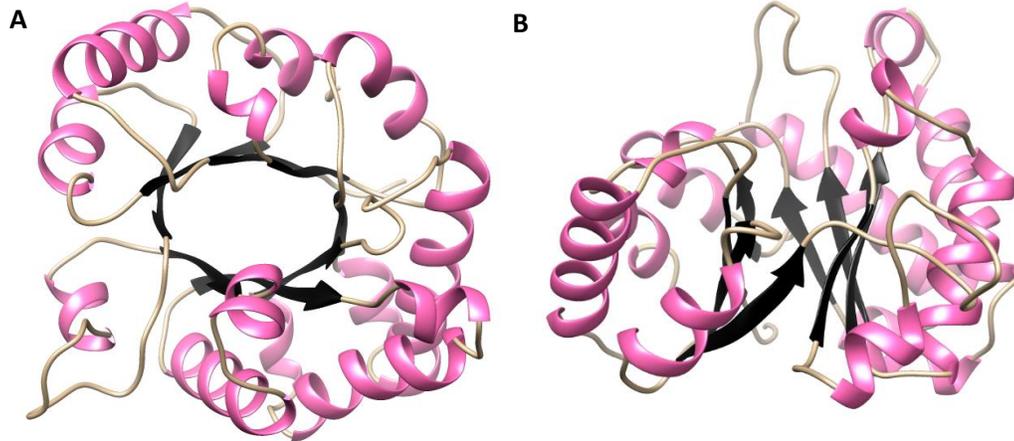


Fig. 2. Plegamiento de barril ($\beta\alpha$)₈ en la trifosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* TbTIM (PDB 5TIM). A) Vista superior (a lo largo del eje del barril). B) Vista lateral.

De las enzimas con estructuras tridimensionales reportadas hasta el momento, el plegamiento de barril (β/α)₈ está presente en más del 10% de las proteínas (Tabla 1), de las cuales el plegamiento de barril TIM presentan cinco de las siete clases de actividades catalíticas clasificadas según la comisión de enzimas (EC): oxidoreductasas, transferasas, liasas, hidrolasas e isomerasas (**Nagano et al., 2002; Pujadas et al., 1999**).

Tabla. 1. Plegamiento más comunes en Enzimas ¹		
Topología	No. de estructuras	%
Rossmann fold	894	35.5
Barril TIM	351	13.9
Alpha-Beta Plaits	166	6.59
Immunoglobulin-like	155	6.16
Jelly Rolls	132	5.24
Nucleotidil transferasa	48	1.9
Fosforilasa Quinasa	47	1.86

¹ Topologías más comunes reportadas en enzimas. Información obtenida de la base de datos de clasificación de estructuras de proteínas CATH (<http://www.cathdb.info>). El porcentaje se obtuvo en relación al número total de enzimas con estructura reportada (2516 estructuras).

1.2. Evolución del plegamiento del barril (β/α)₈

Debido a que algunas enzimas con plegamiento de barril TIM parecen haber evolucionado a partir de la duplicación en tándem de mitades de barril (β/α)₄ (Lang *et al.*, 2000; Seitz *et al.*, 2007; Akanuma & Yamagishi, 2008) o de cuartos de barril (β/α)₂ (Ritcher *et al.*, 2010), se ha propuesto que probablemente subdominios (β/α)_{2N} son precursores del barril (β/α)₈ y la presencia de precursores (β/α)_{2N} que ya exhibían unión o catálisis por separado pudieron dar lugar los progenitores de las superfamilias (Gerlt & Raushel, 2003; Wise & Rayment, 2004). Finalmente, se ha reportado que los plegamientos estables como el barril TIM, así como las características estructurales de su sitio activo se reutilizan con frecuencia en la evolución mediante la duplicación del gen que codificaba a la proteína progenitora, adaptándose para nuevos fines catalíticos (Fig. 3) (Lang *et al.*, 2000; Copley & Bork, 2000).

Inclusive se ha teorizado que estructuras supersecundarias, nivel de organización que representa grupos de elementos estructurales secundarios, $\beta\alpha\beta$ constituyen los bloques básicos dentro del plegamiento de barril TIM (Zitzewitz *et al.*, 1999) y pese a que no se conocen unidades $\beta\alpha\beta$ aisladas y plegadas en la naturaleza ensayos *in silico* han predicho regiones de plegamiento independiente en barriles TIM, delimitados espacialmente por la distancia y naturaleza de los enlaces no covalente de los residuos (Gilbert y Glynias, 1993; Kadamuri *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha propuesto que mediante una construcción modular diferente de la hipotética unidad (β/α)_{2N}, se podría

haber formado el plegamiento de barril $\beta\beta\alpha\alpha$ (β/α)₆ de la enolasa (**Lebioda y Brewer, 1989**), o el plegamiento (β/α)₅ de las proteínas de familia flavodotoxina-like (**Höcker et al., 2002**) o incluso proteínas con 7 hebras β como la flavoproteína 390 (**Moore et al., 1993**), la fosforribosil transferasa de ácido quinolínico (**Eads et al., 1997**) y algunas celulasas (**Rouvinen et al., 1990; Sperio et al., 1993**).

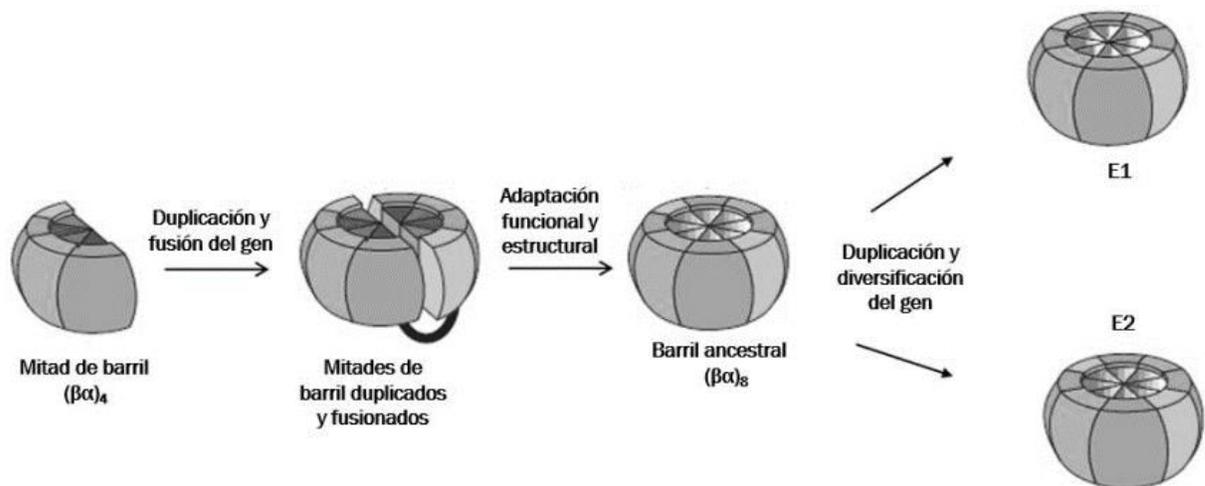


Fig. 3. Modelo para la evolución del andamio del barril (β/α)₈ mediante la duplicación y fusión de genes. Un gen que codificaba para una unidad (β/α)₄ se duplicó y fusionó, posteriormente mediante adaptaciones estructurales y funcionales se generó un barril ancestral (β/α)₈ que finalmente a través de una o varias duplicaciones se diversificó el gen dando lugar a enzimas con actividades catalíticas variadas. Modificado de Lang *et al.*, 2000.

La estructura del barril TIM contiene un sitio catalítico evolutivamente maleable, lo que representa un andamio ideal para facilitar la migración entre cofactores y sustratos, permitiendo una diversificación funcional (**Goldman et al., 2016**). E incluso se ha logrado migrar la actividad de un barril (β/α)₈ de triosafosfato isomerasa (TIM) a tiamina fosfato sintasa (TPS), dos reacciones no relacionadas y que utilizan sustratos diferentes con diferentes estados de transición (**Saab et al., 2011**). Las semejanzas en secuencia, estructura y función de varios barriles (β/α)₈ de las vías biosintéticas del triptófano e histidina sugieren una evolución divergente a partir de un medio barril ancestral común. Particularmente, las enzimas N'[(5'-fosforibosil) formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleótido isomerasa (HisA) e imidazol glicerol fosfato sintasa (HisF)

que catalizan dos reacciones consecutivas de la biosíntesis de histidina, pueden convertirse mediante el intercambio de un solo aminoácido en el sitio activo (D127V en HisA y D130V en HisF) en enzimas con actividad fosforibosilantranilato isomerasa (TrpF) (**Jürgens et al., 2000; Leopoldsede et al., 2004**).

En el presente trabajo para abordar la hipótesis de las proteínas con plegamiento de barril (β/α)₈ provienen de fragmentos más pequeños se decidió utilizar como modelos de estudio las enzimas triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma brucei* y fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI) de *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales a pesar de presentar un sitio conservado de unión a fosfato, no tienen una relación evolutiva muy estrecha según la clasificación de las familias de barriles TIM de Nagano et al (2000) e incluso provienen de dos organismos eucariotas evolutivamente distantes.

1.3. Triosafosfato isomerasa (TIM)

La triosa fosfato isomerasa (TIM) es una enzima que participa en la glucólisis, catalizando la interconversión entre dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y D-gliceraldehído-3-fosfato (GAP) mediante un intermediario enediol. Esta enzima se compone de dos subunidades idénticas asociadas a través de interacciones no covalentes para formar un homodímero α_2 (Fig. 5A); pese a que cada sitio activo de la TIM actúa de manera independiente, la enzima presenta actividad catalítica sólo cuando se encuentra en su forma dimérica (**Schnackerz y Gracy, 1991**). En *Trypanosoma brucei* el dímero de la enzima TIM (TbTIM) se forma por dos cadenas polipeptídicas de 250 aminoácidos cada una, con una masa de 27 KDa (**Wierenga et al., 1991**).

1.3.1. Estructura de la Triosafosfato Isomerasa

En la estructura de barril TIM de *Trypanosoma brucei* las asas $\beta\alpha$ que conectan las hebras β y las hélices α son las que contienen a los residuos catalíticos, específicamente el asa 1 (N11, K13), asa 4 (H95) y asa 6 (E167). El asa 3 emerge de cada monómero y se inserta en la cavidad, cercano al asa1 y 4 del otro monómero, en donde establece interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno con Lys13 y Glu97. Esta asa 3 no interviene en la catálisis, pero es importante en la estabilidad del dímero, ya que aproximadamente el 80% de las interacciones involucran átomos de esta asa que restringen las conformaciones del sitio activo (**Knowles, 1991**).

1.3.2. Mecanismo catalítico de TIM

TIM está involucrada en el proceso de la glucólisis, catalizando la interconversión de los productos de la Aldolasa, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el D-gliceraldehído-3-fosfato (GAP). Se ha propuesto que la catálisis se lleva a cabo mediante un mecanismo ácido-base, en donde la unión del sustrato al sitio activo posiciona el residuo E167 sobre el C1 del DHAP, o el C2 de GAP, abstrayendo el protón y generando un intermediario enediol (ato) cargando negativamente el O2, el cual es estabilizado por puentes de hidrógeno con los residuos K13 y H95 (Rieder & Rose, 1959; Lodi & Knowles, 1991). En la segunda parte de la reacción el H95 actúa como ácido, transfiriendo un protón al O2 y abstrayendo un protón del O1, finalmente el E167 transfiere el protón anteriormente sustraído al C2 del sustrato. Los grupos R de N11 y K13 posicionados debajo del intermediario enediol (ato) permiten la transferencia del H por el E167 (Fig. 4) (Albery & Knowles, 1977; Schliebs *et al.*, 1997).

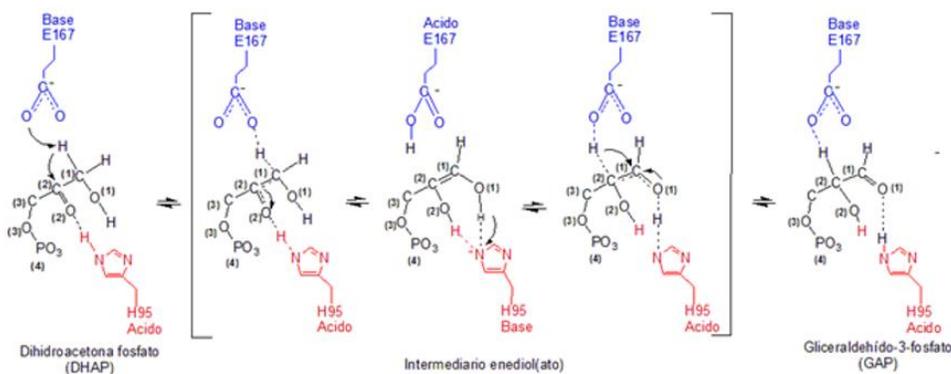


Fig. 4. Interconversión de DHAP a GAP catalizado por la triosafosfato isomerasa. Tomado de Damián-Almazo, no publicado.

1.3.3. Monómero TIM de *Trypanosoma brucei*

A través de la ingeniería de proteínas se han generado variantes monoméricas de la enzima TIM en *Trypanosoma brucei* (Borchert *et al.*, 1993a) y *Trypanosoma cruzi* (Zárate-Pérez *et al.*, 2009). Borchert y colaboradores mediante la delección y la modificación de los residuos 68-82 del asa $\beta\alpha 3$ por residuos más hidrofílicos generó una variante monomérica soluble de la TIM de *T. brucei* de 26 kDa. No obstante, esta enzima es menos estable que la enzima silvestre, $T_m=38^\circ\text{C}$ MonoTIM vs $T_m=41^\circ\text{C}$ TIM silvestre

(Borchert *et al.*, 1993a), y tiene actividad aproximadamente 20 veces menor y un número de recambio 1000 veces menor a la enzima dimérica

(Borchert *et al.*, 1993a; Borchert *et al.*, 1993b).

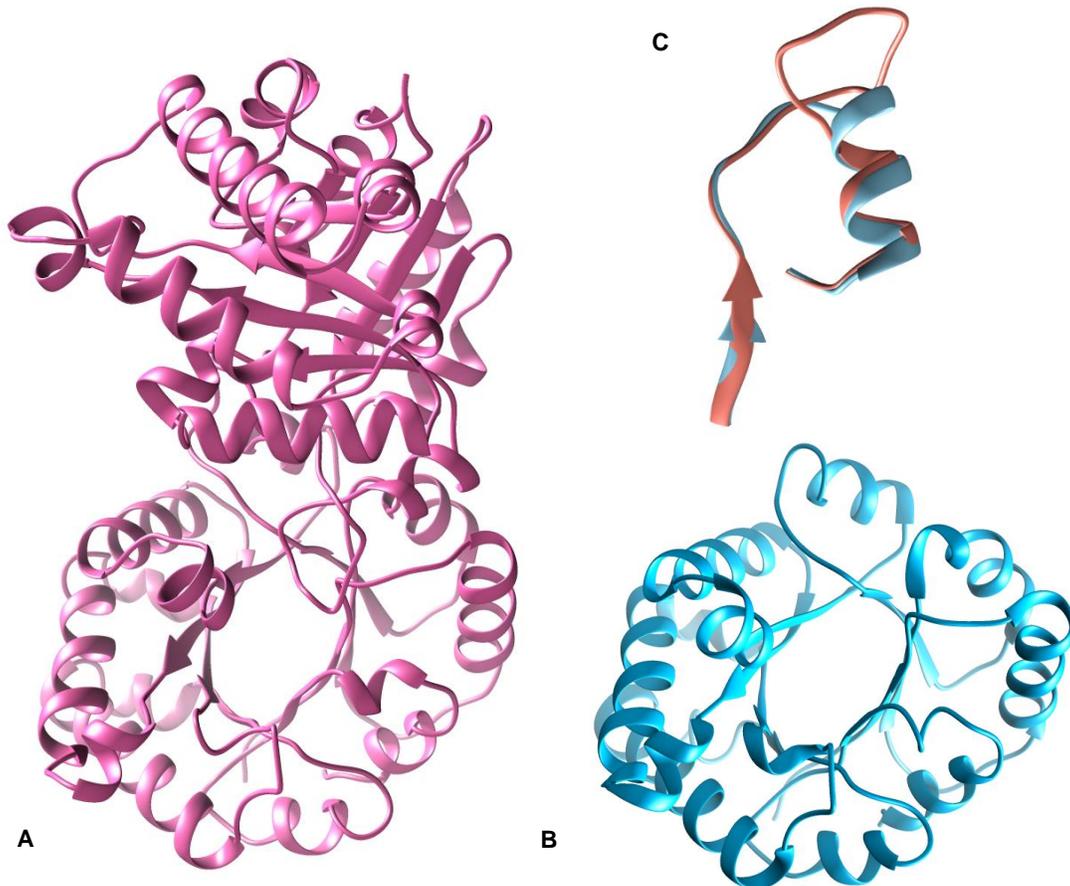


Fig. 5 A) Estructura de la enzima TIM de *T. brucei* (PDB 4TIM). **B)** Estructura de la variante monomérica TbMonoTIM (PDB 2WSR). **C)** Alineamiento del asa 3 de TbTIM y TbMonoTIM, rosa y azul respectivamente.

Estos resultados pueden explicarse mediante la estructura cristalográfica de MonoTIM que muestra una alteración topológica de las asas 1 y 4 afectando la posición de algunos residuos involucrados en la catálisis (Lys13 y His95). Posteriormente y con la finalidad de incrementar la actividad catalítica de MonoTIM, Saab y colaboradores diseñaron una estrategia mediante mutaciones al azar del gen completo y del asa 2, obteniendo como resultado el cambio Ala43Pro y Thr44Ala/Ser en la mutación del gen completo y Ala43Pro y Thr44Arg en las mutaciones azarosas del asa 2 (**Fig. 5B**). Estos cambios favorecieron el incremento de aproximadamente 11 veces en la k_{cat} ($3.48 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$) y una disminución

de 4 veces en la K_m (1.1 mM), respecto a la MonoTIM original (K_m 0.25 mM y k_{cat} 3.7×10^5) (Saab *et al.*, 2001).

1.4. Fosforibosil antranilato isomerasa (PRAI)

La fosforibosil antranilato isomerasa (PRAI) es una enzima con plegamiento de barril TIM, que forma parte de la ruta de biosíntesis del triptófano catalizando el paso de la fosforibosil antranilato a carboxifenilamino. Mientras que en levaduras PRAI se encuentra en forma monomérica, en *Escherichia coli* está unida a la indol-3-glicerol-fosfato sintasa (IGPS), formando el complejo bifuncional PRAI:IGPS (Fig. 6).

1.4.1. Estructura de la Fosforibosil antranilato isomerasa

El complejo PRAI:IGPS está conformado por 2 dominios con estructura de barril TIM conectadas por un segmento de tres aminoácidos (residuos 255-257). El primer dominio cataliza la reacción de síntesis de indol glicerol fosfato (IGPS) (residuos 1-254), mientras que el segundo dominio cataliza la reacción de isomerización del fosforibosil antranilato (PRAI) (residuos 258-452). Los sitios activos de estos dos dominios no están cara a cara, lo que descarta la transferencia directa del sustrato CdRP, producto de la isomerasa. Asimismo, aunque no se ha demostrado algún cambio conformacional entre ambos dominios, si se separa a nivel de gen la enzima bifuncional, se obtienen 2 enzimas plegadas con una eficiencia catalítica prácticamente idéntica a las de los dominios de la enzima bifuncional (Priestle *et al.*, 1987; Hommel *et al.*, 1995, Eberhard *et al.*, 1995).

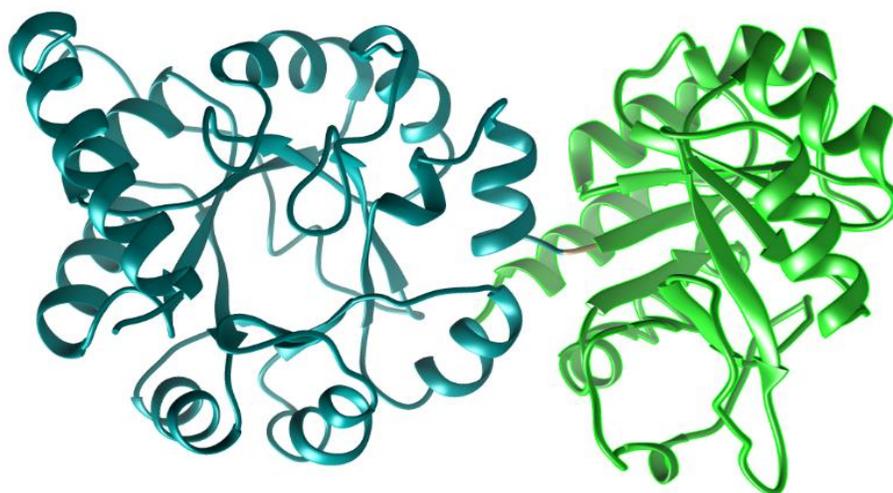


Fig. 6. Estructura del complejo bifuncional IGPS:PRAI (en azul se representa la enzima IGPS y verde la enzima PRAI) (PDB 1PII).

El dominio correspondiente a PRAI presenta plegamiento tipo TIM, pero a diferencia del plegamiento canónico, PRAI de *E. coli* sólo presenta siete hélices α alrededor del anillo central de ocho hebras β , debido probablemente a la presencia de una prolina (P366) que se encuentra dentro de un asa de 14 aminoácidos en la posición donde debería estar la hélice $\alpha 5$. Los aminoácidos catalíticos de PRAI se localizan en los extremos carboxilo terminal de las hebras $\beta 1$ y $\beta 6$ (Henn-Sax *et al.*, 2002).

1.4.2. Mecanismo catalítico de PRAI

PRAI participa en la biosíntesis del triptófano, catalizando la interconversión de la aminoaldol N-(5'-fosforibosil) antranilato (PRA) en aminocetosa 1-O-carboxifenilamino-1-deoxiribulosa-5-fosfato (CdRP) a través de un rearrreglo de Amadori (Kirschner *et al.*, 1987; Hommel *et al.*, 1995). En el sitio activo de PRAI los residuos catalíticos D126 y C7 participan en una catálisis ácido-base, en este mecanismo el O de la furanosa es protonado por el grupo R del D126, generando un intermediario tipo base de Schiff entre el anillo del carboxifenilamino y la ribosa, posteriormente el residuo C7 abstrae un protón del C2' de la ribosa generando la forma enólica del CdRP la cual se tautomeriza de forma espontánea a su forma ceto (Fig. 7) (Hommel *et al.*, 1995).

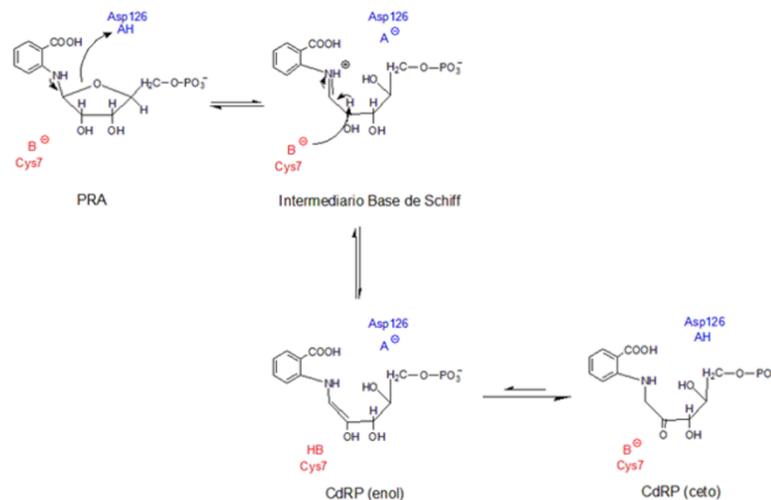


Fig. 7. Mecanismo de isomerización de PRA a CdRP. Tomada de Resinger *et al.*, 2012.

2. ANTECEDENTES

La hipótesis de que los barriles TIM, a pesar de ser de un solo dominio, se forman a partir de módulos independientes más pequeños se ha corroborado mediante ensayos de desnaturalización y replegamiento en los cuales se identifica un intermediario en el que participan al menos las primeras seis subunidades $(\beta/\alpha)_{1-6}$ de la subunidad α de la triptófano sintetasa, y que fungen como templado de las dos últimas unidades del carboxilo terminal (**Crisanti y Matthews, 1981; Miles et al., 1982; Eder y Kirschner, 1992; Zitzewitz et al., 1999**).

Otros experimentos que dan soporte a esta hipótesis son los de Shukla y Guptasarma en los que al fragmentar el barril demostraron que existen segmentos $\beta\alpha$ que poseen la capacidad de plegarse de manera independiente. Incluso, si se cambian el orden de alguno de estos segmentos en la cadena polipeptídica se generan construcciones capaces de plegarse de manera similar a la enzima silvestre (**Shukla y Guptasarma, 2004**). Por otro lado, se han generado segmentos $(\beta/\alpha)_4$ en genes bicistrónicos capaces de plegarse y asociarse *in vivo*, manteniendo su función catalítica (**Soberón et al., 2004**).

Otros estudios en los que se expresó sólo una mitad de barril HisF, ya sea el N-terminal (HisF-N) o el C-terminal (HisF-C), éstas se presentan como homodímeros, completando el barril, con estructura secundaria y terciaria nativa, aunque sin actividad catalítica. Sin embargo, si son coexpresadas *in vivo* o replegadas juntas *in vitro*, se ensambla un heterodímero HisF-NC catalíticamente activo (**Höcker et al., 2001**). Un trabajo ulterior del mismo grupo de investigación simuló la evolución de un barril $(\beta/\alpha)_8$ a partir de la unidad $(\beta/\alpha)_4$ HisF-C, duplicándolo, fusionándolo y optimizando el plegamiento para obtener un monómero estable HisF-CC (**Höcker et al., 2004**).

Cabe destacar que ensayos *in vitro* han demostrado que es posible formar quimeras estables a partir de enzimas homólogas con plegamiento TIM presentes en organismos tanto cercanos como alejados taxonómicamente. Algunos de estos ensayos se han hecho con mitades de barril de endoglucanasas mesófilas y termófilas, dando como resultado enzimas que comparten características cinéticas y de estabilidad térmica, de ambas enzimas silvestres (**Sharma et al., 2016; Zheng et al., 2019**).

Bajo la hipótesis de que los dominios proteicos evolucionaron a partir de subunidades más pequeñas, Wang y colaboradores han analizado los módulos, motivos de 40-120 aa que se presenta en proteínas no relacionadas, $\beta\alpha$ y $\alpha\beta$ de barriles TIM mediante alineamientos de secuencia y estructura de dominios parciales de barriles TIM para construir quimeras con funciones novedosas. Sin embargo, para que las quimeras construidas pudieran plegarse debieron realizar mutaciones puntuales que optimizaban el interior del barril evitando impedimentos estéricos, posteriormente fueron requeridas 6 rondas de evolución dirigida para obtener quimeras plegadas correctamente (**Wang et al., 2017**). Inclusive se han formado barriles TIM estables, monoméricos y con desplegamiento cooperativo, partiendo de fragmentos de proteínas reguladoras de respuesta con plegamiento de tipo flavodoxina (CheY y NarL) y piezas del barril ($\beta\alpha$)8 HisF (**Bharat et al., 2008; Eisenbeis et al., 2012; Shanmugaratnam et al., 2012; Farías-Rico et al., 2014**). Por último, experimentos en los cuales se complementa la actividad de TIM de músculo de pollo mediante la fusión de fragmentos obtenidos a partir de los sitios que delimitan los exones, algunos de los cuales caen dentro de los elementos de estructura secundaria (**Bertolaet y Knowles, 1995**), sugieren que los segmentos $\beta\alpha$ no necesariamente representa una unidad mínima de plegamiento, la cual puede incluso estar formada por fragmentos en los que los elementos de estructura secundaria se encuentran interrumpidos.

2.1. Permutación circular

El concepto de permutación circular en proteínas indica el rearreglo de los segmentos de las estructuras secundarias mediante la unión covalente de las regiones amino y carboxilo terminal mediante un nuevo enlace peptídico seguido de la ruptura de un enlace peptídico ya existente en algún otro sitio de la proteína. Este proceso no sustituye ningún aminoácido de la secuencia, simplemente reorganiza el orden de los residuos dentro de la cadena polipeptídica.

La permutación circular de proteínas fue descrita por primera vez en 1979 por Cunningham y colaboradores quienes determinaron la secuencia de una lectina de leguminosa (favina) y observaron que tenía cierta similitud con otra lectina conocida (concaivalina A) sólo que esta última parecía contener una permutación circular en la

región carboxilo terminal (**Cunningham et al., 1979; Einspahr et al., 1986**). Posterior a este descubrimiento varios grupos de investigación intentaron emular este proceso y finalmente en 1983 se reportó la primera permutación circular en la tripsina pancreática de bovino mediante la ligación química de los términos amino y carboxilo con un conector Lya-Ala generando una proteína cíclica e introduciendo nuevas regiones terminales en las asas externas de la proteína mediante la acción catalítica de la tripsina (**Fig. 8A**) (**Goldenberg et al., 1983**). Sin embargo, esta aproximación no puede ser fácilmente aplicable a otras proteínas, así como tampoco proporciona información acerca del plegamiento de proteínas *in vivo*. Debido a estos problemas y a que el propio concepto de permutación circular prometía ser una buena estrategia para el estudio del plegamiento, Luger y colaboradores introdujeron un método a nivel de gen que permitía realizar permutaciones circulares fragmentando y ligando el DNA (**Luger et al., 1989**).

Pese a que la metodología de Luger y colaboradores permitió introducir permutaciones en sitios arbitrarios a lo largo de toda la secuencia del gen y no sólo en las regiones más expuestas, estas modificaciones se realizaban insertando sitios de restricción que condicionaba la exploración de nuevas terminaciones a lo largo de todo el gen. Debido a esto Graf y Schachman optimizaron la permutación a nivel de gen utilizando endonucleasas no específicas para crear permutaciones azarosas. En esta estrategia se unen los nucleótidos que codifican por los extremos amino y carboxilo de la proteína mediante un conector y se omiten los codones de inicio y término generando una secuencia de DNA circular. Por último, utilizando concentraciones bajas de una endonucleasa no específica se digiere de forma azarosa el DNA circularizado (**Fig. 8B**) (**Graf y Schachman,1996**).

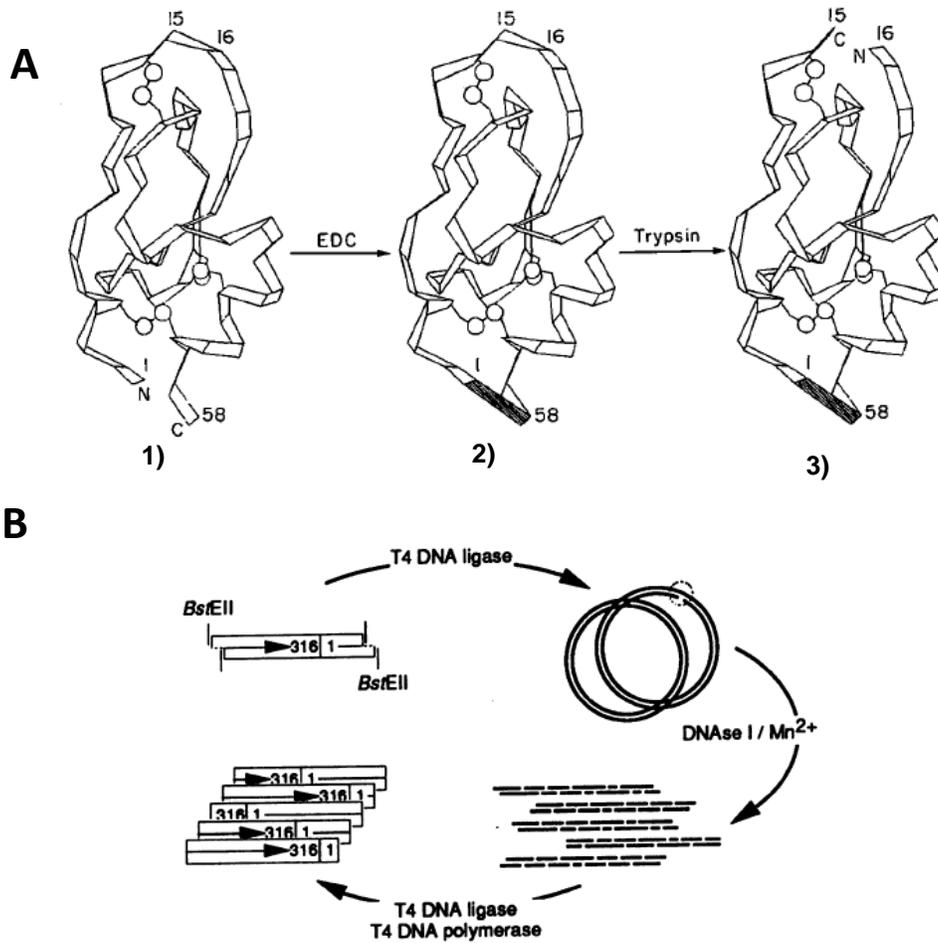


Fig. 8. Permutación circular. **A)** Permutación circular de la proteína BPTI (inhibidor de tripsina de páncreas bovino). 2. Los extremos N y C terminal se unieron mediante una reacción con carbodiimida; 3. La formación de los nuevos extremos N y C se realizó mediante lisis catalizada por tripsina. Tomado de Goldenberg y Creighton, 1983. **B)** Permutación circular azarosa a nivel de gen. En esta metodología el gen de interés es circularizado y posteriormente es digerido con Dnasas y ligado nuevamente. Tomado de Graf y Schachman, 1996.

2.2. Permutación circular azarosa de TIM y PRAI

Con el objetivo de identificar regiones que muestren núcleos de plegamiento independiente en proteínas con plegamiento tipo TIM, Damián-Almazo generó una librería de permutaciones circulares azarosas de TbMonoTIM, variante monomérica de la enzima dimérica trifosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*, y de yPRAI, una fosforibosil antranilato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (datos no publicados).

Sus resultados arrojaron variantes permutadas estables, cuyos nuevos inicios se encuentran distribuidos prácticamente a lo largo de toda la proteína, incluyendo inicios localizados en asas y en hebras β , aunque también algunas se localizaron en los extremos amino y carboxilo de hélices α (**Fig. 9**).

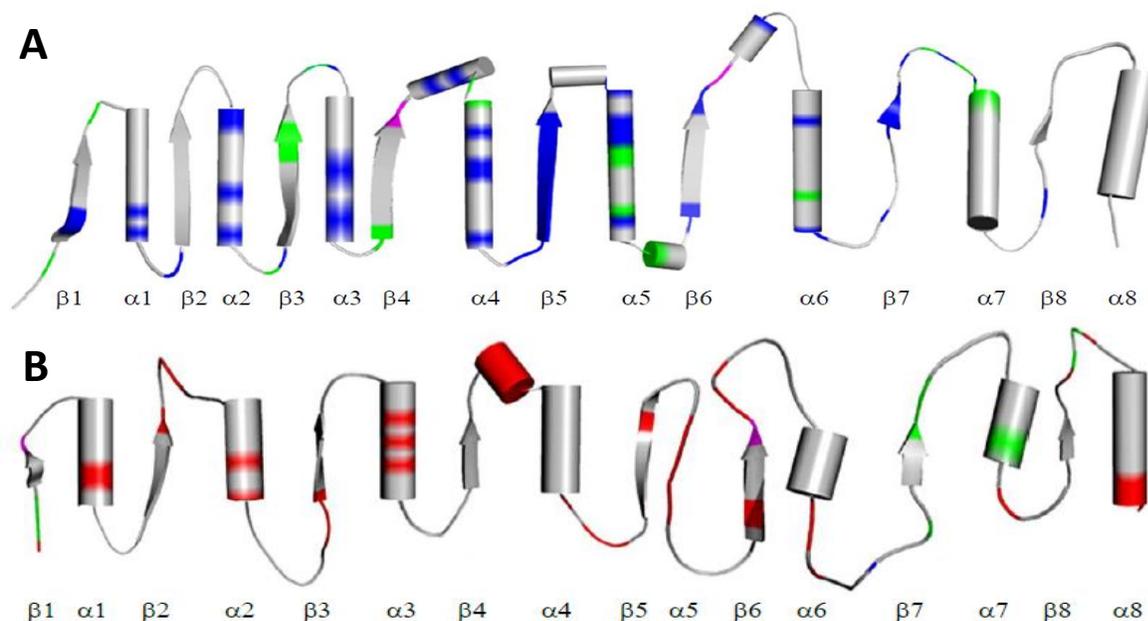


Fig. 9. Distribución de los nuevos inicios amino terminales de las permutaciones circulares secuenciadas y seleccionadas por plegamiento (azul en A y rojo en B) y actividad (verde en ambas) del banco de permutaciones azarosas. Los residuos catalíticos se muestran en magenta. **A)** Estructura de TbMonoTIM (PDB 2WSR). **B)** Estructura de ePRAI (PDB 1PII) utilizada como modelo de γ PRAI. Modificado de Damián-Almazo (datos no publicados).

La información obtenida a partir del mapeo de las regiones permisibles para realizar permutaciones circulares, indica tal y como lo han sugerido las separaciones de exones (**Gilbert y Glyniadis, 1993; Bertolaet y Knowles, 1995**), que las subunidades de plegamiento no necesariamente están formadas por subunidades $(\beta/\alpha)_{2N}$ y que incluso pueden contener elementos de estructura secundaria interrumpidos. En el presente trabajo pretendemos utilizar la información generada en las permutaciones circulares para diseñar quimeras de estas proteínas.

3. HIPÓTESIS

Los módulos de plegamiento determinados en las enzimas TIM y PRAI permitirán construir quimeras capaces de plegarse, pese a que, entre ambas proteínas no hay evidencia de homología por identidad de sus secuencias.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Construir proteínas quimera con capacidad de plegarse, utilizando la información derivada del mapeo de módulos de plegamiento a partir de los ensayos de permutación circular en las enzimas PRAI y TIM.

4.2. Objetivos Particulares

- Identificar posiciones equivalentes entre las proteínas TIM y PRAI que delimiten subunidades de plegamiento
- Construir quimeras con puntos de intersección en las regiones identificadas en el mapeo y fusionarlas a un reportero de plegamiento
- Seleccionar las quimeras que presentan plegamiento
- Separar la proteína quimera del dominio reportero de plegamiento
- Verificar si la quimera presenta plegamiento cooperativo

5. MÉTODO

5.1. Selección de los fragmentos con plegamiento autónomo para la construcción de las quimeras

Los fragmentos utilizados para construir las quimeras fueron seleccionados tomando como referencia los resultados obtenidos por Damián-Almazo (datos no publicados), en donde identificó los núcleos de plegamiento independiente de las enzimas yPRAI y TbMonoTIM. Con esta información y mediante un alineamiento de las estructuras tridimensionales de la enzima TbMonoTIM (PDB 2WSR) y ePRAI (PDB 1PII), con ayuda del visualizador Pymol, se determinaron aquellos núcleos de plegamiento equivalentes entre ambas estructuras (**Fig. 10A**). Se tomó como criterio principal que ambos sitios equivalentes estuvieran espacialmente cercanos para evitar alterar en la mayor medida

posible la estructura tridimensional. El segundo criterio fue explorar las estructuras secundarias α -hélice y hebra- β , así como las asas C y N terminal.

5.2. Diseño de oligonucleótidos y construcción de los genes quiméricos

Se diseñaron cebadores que flanquean a los genes MonoTIM y PRAI, los cuales insertan los sitios de restricción EcoRI y NdeI en la región 5' y BamHI en la región 3' (que se subrayan), los cuales son necesarios para clonarlos en el vector de selección.

Tabla 2.	
Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'
PRAI_EcoNde_F	ATCATGAATTCTAAGAAGGAGATATACATATGTCTGTTATTAATTTACAG
PRAI_BamHI_R	TTATAGGATCCTTTCTTAGCATTTTTGACG
MON_EcoNde_F	TACTAGAATTCTAAGAAGGAGATATACATATGTCCAAGCCACAACCCATCG
MON_BamHI_R	ATCATGGATCCCTGAGTGGCTTTGATGATGTC

Por otro lado, se diseñaron los oligonucleótidos que permitirán crear las quimeras mediante sobrelapamiento, por lo tanto, para diseñar estos oligonucleótidos se tomaron algunas consideraciones específicas. Estos cebadores hibridan aproximadamente 15 nucleótidos en la región específica de cada gen, unidos mediante un conector degenerado NNG/C el cual permite explorar los 20 aminoácidos (además de un codón de paro) en el sitio de intersección.

Oligonucleótidos para generar las quimeras

Tabla 3.1	
Quimeras PRAI5'/MonoTIM3'	
CEBADOR	5' → 3'
PRAIN_asa $\alpha_2\beta_3$ _Fw	AAA AAT AGT TCA GGC ACT NN(G/C) NN(G/C) TTT GTG ATT GCG GCG
PRAIN_asa $\alpha_2\beta_3$ _Rv	CGC CGC AAT CAC AAA (G/C)NN (G/C)NN AGT GCC TGA ACT ATT TTT
PRAIN_Hélice α_3 _Fw	GAG GAT GTT TTG GCT CTG NN(G/C) AAA GAT TTC GGT GTC AAC
PRAIN_Hélice α_3 _Rv	GTT GAC ACC GAA ATC TTT (G/C)NN CAG AGC CAA AAC ATC CTC
PRAIN_asa $\beta_4\alpha_4$ _Fw	GTC CAA CTG CAT GGA GAT NN(G/C) GAG ACA AAC GAG ATT GTT

PRAIN_asa $\beta_4\alpha_4$_Rv	AAC AAT CTC GTT TGT CTC (G/C)NN ATC TCC ATG CAG TTG GAC
PRAIN_Hebraβ_5_Fw	CTC GGT TTG CCA GTT ATT NN(G/C) TGC ATC GGC GAA ACG CTG
PRAIN_Hebraβ_5_Rv	CAG CGT TTC GCC GAT GCA (G/C)NN AAT AAC TGG CAA ACC GAG

Tabla 3.2	
Quimeras MonoTIM5'/PRAI3'	
CEBADOR	5' → 3'
TIMN_asa$\alpha_2\beta_3$_Fw	AAG GAG CGT CTT TCA CAC NN(G/C) NN(G/C) TAC TTG GTT GGC GTG
TIMN_asa$\alpha_2\beta_3$_Rv	CAC GCC AAC CAA GTA (G/C)NN (G/C)NN GTG TGA AAG ACG CTC CTT
TIMN_Héliceα_3_Fw	GCT GAC GCT CTG GCT TCC NN(G/C) AAT GAT TAC GGC ATT GAT
TIMN_Héliceα_3_Rv	ATC AAT GCC GTA ATC ATT (G/C)NN GGA AGC CAG AGC GTC AGC
TIMN_asa$\beta_4\alpha_4$_Fw	CGC CGC GCA TAC TAT NN(G/C) NN(G/C) GAG TCG TGG CAA GAA TAC
TIMN_asa$\beta_4\alpha_4$_Rv	GTA TTC TTG CCA CGA CTC (G/C)NN (G/C)NN ATA GTA TGC GCG GCG
TIMN_Hebraβ_5_Fw	TCT GGT TTC ATG GTT ATT NN(G/C) AGA CTC GTA TTT CCA AAA
TIMN_Hebraβ_5_Rv	TTT TGG AAA TAC GAG TCT (G/C)NN AAT AAC CAT GAA ACC AGA

Para construir los genes quiméricos se realizó una estrategia de dos PCR consecutivas. En la primera PCR se amplificó el fragmento de interés utilizando los cebadores que adicionaron una pequeña secuencia homóloga al fragmento de la otra enzima. Con los fragmentos obtenidos del primer ensayo se realizó una segunda PCR en donde los fragmentos amplificados anteriormente se sobrelaparon, generando un fragmento quimérico (**Fig. 10B**).

5.3. Clonación de los genes quimera

Una vez obtenidas las secuencias quiméricas, éstas se clonaron en el vector pUC-CAT, el cual tiene insertada una secuencia nucleotídica entre el promotor y el inicio del gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) rompiendo el ORF (**Fig. 10C**). Para ello, se realiza una digestión doble al amplificado obtenido de la PCR de sobrelapamiento utilizando las enzimas EcoRI y BamHI, que cortan la región 5' y 3' del gen quimérico, respectivamente. Esta doble digestión nos permite evitar falsos positivos

por autoligación, ya que sólo una secuencia que contenga estas dos regiones puede restablecer el marco de lectura de CAT. La digestión doble se incubó toda la noche a 37°C, finalmente se le aplica un pulso de temperatura a 80°C/2min para detener la reacción. Los fragmentos digeridos se purificaron con ayuda del kit “High pure PCR purification Kit” (ROCHE) y finalmente se realizó un ensayo de ligación del fragmento quimera y el vector pUC-CAT, la ligación se incubó a 16°C toda la noche. Por último, el DNA ligado se precipitó con n-butanol y se transformó en bacterias electrocompetentes *E. coli* cepa MC1061, las cuales se plaquearon en cajas de LB/Ap y se incubaron toda la noche a 37°C.

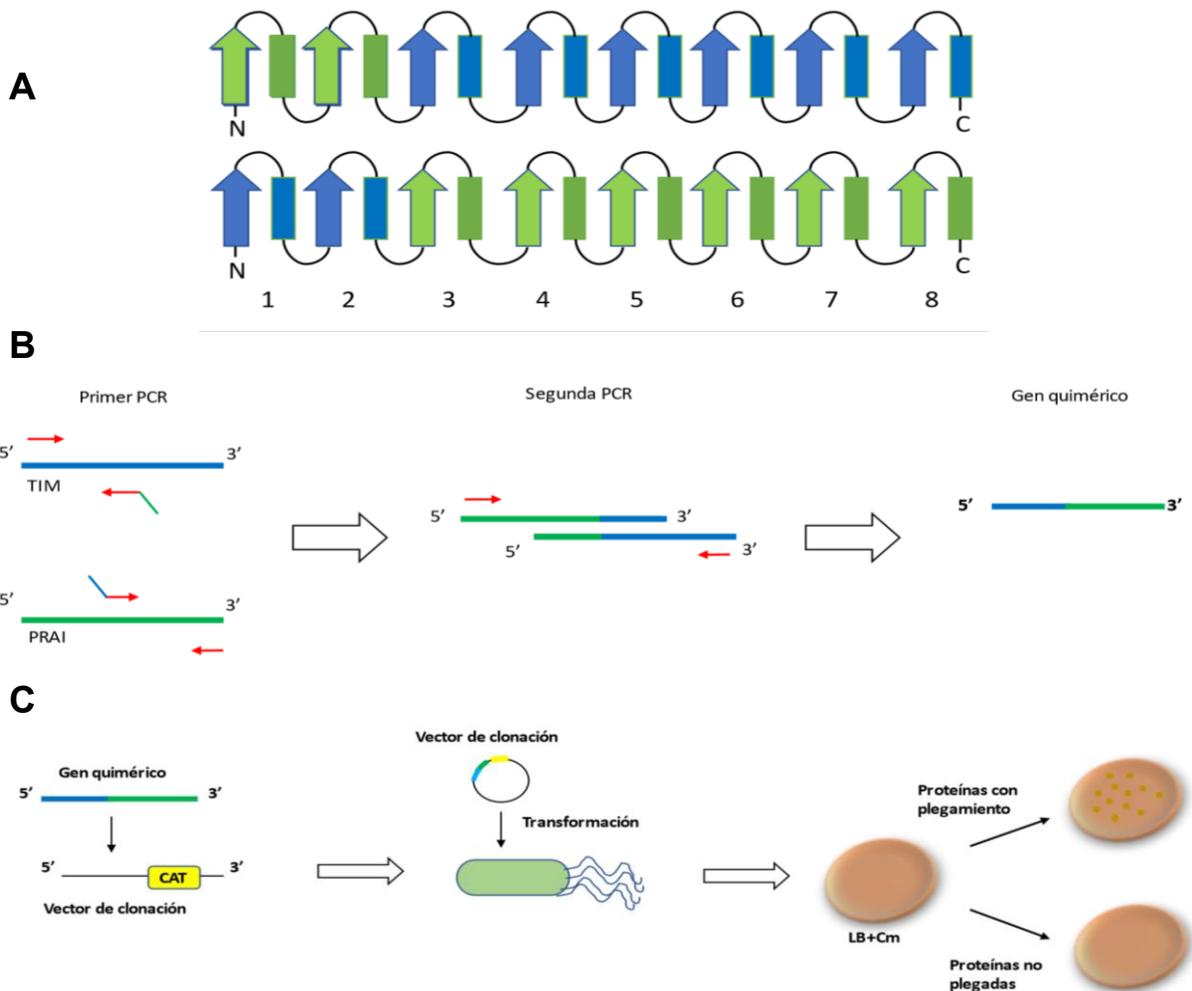


Fig. 10. Estrategia de construcción y selección de las secuencias quiméricas. **A)** Esquema de la construcción de la proteína quimera, tomando el primer módulo equivalente entre ambas enzimas. **B)** Diagrama de los ensayos de PCR realizados para construir los genes quiméricos. **C)** Diagrama de clonación y selección de las variantes plegadas. La explicación del diagrama se encuentra en la sección de Métodos.

5.4. Selección de las variantes solubles

Del banco de las quimeras transformadas en *E. coli* cepa MC1061 se seleccionaron las colonias aisladas (~900), se picaron en cajas de LB/Ap y LB/Cm 30 µg/mL y se incubaron a 37°C/16h. En un ensayo posterior se eligieron todas las colonias crecidas en LB/Cm 30 µg/mL y se sembraron en cajas LB/Cm 50 µg/mL (**Fig. 10C**). Para descartar falsos positivos en las placas donde hubiera crecimiento, se procedió a realizar una PCR de colonia al menos a 20 de ellas. Se mandaron a secuenciar las 5 colonias que presentaron un producto de PCR del PM esperado. Finalmente, con ayuda del servidor Clustal Omega (**Sievers, et al., 2011**) se realizó un alineamiento múltiple entre la secuencia quimérica consenso (secuencia que no contiene el conector) y las 5 secuencias obtenidas.

5.5. Expresión heteróloga

Al tener identificadas las variantes de la quimera que presentaron plegamiento se procedió a retirar el cassette de CAT, reamplificando las secuencias quimera con los cebadores PRAI_EcoNde_F y MON_HindIII_R que insertan los sitios de restricción NdeI en la región 5' y HindIII en la región 3', respectivamente. La presencia de los sitios de restricción NdeI y HindIII flanqueando a la quimera nos permitió clonarla en el vector de expresión pET22 de tal forma, que el gen quimera queda en fase con la secuencia que codifica para seis residuos de histidina. Finalmente, los plásmidos se transformaron en la cepa ER de *E. coli* y se indujo la expresión de la proteína quimera mediante 0.3 mM de IPTG. Se lisaron las células después de 12 h de crecimiento y se analizaron mediante PAGE las fracciones solubles e insolubles para determinar en qué fracción se encontraban las proteínas quiméricas.

5.6. Recuperación de proteínas de cuerpos de inclusión

Debido a que las proteínas quimeras se encontraban en agregados se realizó el protocolo de recuperación de proteínas de cuerpos de inclusión. La proteína se expresó como se menciona en el apartado "Expresión heteróloga". El cultivo se centrifugó a 5,000 RPM/4°C/20 min, se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron en buffer PBS con DTT (30 mg/L). Las células se lisaron mediante sonicación, para separar los restos celulares solubles e insolubles se centrifugaron a 10,000 RPM/4°C/30 min. La

pastilla obtenida de la centrifugación se resuspendió en buffer de fosfatos (15 mM) con 9 M de urea y se mantuvo en agitación lenta constante durante 1h/4°C. Para separar los restos celulares no disueltos en urea se centrifugó nuevamente a 10,000 RPM/4°C/30 min. Posteriormente, la proteína presente en el sobrenadante se replegó en buffer de fosfatos (15 mM) en presencia y en ausencia de arginina 1 M. Finalmente, para separar los agregados y las proteínas solubles, la muestra se centrifugó a 10,000 RPM/4°C/30min y el sobrenadante se filtró a través de membranas con poros de 0.22 µm.

5.7. Purificación de las proteínas quimera

Las proteínas recuperadas de los cuerpos de inclusión se dializaron en buffer de fosfatos (50 mM fosfatos, 250 mM NaCl) para retirar las sales y purificar mediante cromatografía de afinidad. Posterior a la diálisis se centrifugó a 10,000 RPM/4°C/30 min para separar las proteínas agregadas y se filtró el sobrenadante a través de membranas con poros de 0.22 µm. Finalmente, la proteína replegada en el buffer de fosfatos (50 mM fosfatos, 25 mM NaCl) se purificó mediante columna de Ni²⁺, con una concentración final de 100 mM imidazol para eluir completamente la proteína quimera. Por último, la proteína purificada se centrifugó y filtró como se describió anteriormente, fue se dializada toda la noche en buffer de fosfatos con NaF (10 mM fosfatos, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, DTT 30 µg/L) y posteriormente se concentró a 1 mg/mL aproximadamente.

5.8. Desplegamiento/replegamiento térmico

Para el ensayo de desnaturalización y replegamiento se ajustó la concentración de proteína a 0.3 mg/mL. La muestra se incubó durante 10 min a 10°C en un espectropolarímetro marca Jasco modelo J715 y una vez equilibrada la temperatura, se sometió a un proceso de desnaturalización térmica mediante un barrido de temperatura de 15° a 80°C y de renaturalización de 80° a 15°C. Los datos se colectaron con incremento/decremento de 1°C/min. El cambio estructural de la proteína fue monitoreado mediante el cambio de señal a 222 nm mediante dicroísmo circular (CD), para detectar cambios en la estructura secundaria. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Savuka (**Ionescu et al., 2000**) para ajustarlo a un modelo de dos estados y determinar la T_m.

5.9. Desplegamiento con urea

A partir del buffer de fosfatos (15 mM) se prepararon soluciones con concentraciones crecientes de urea de (0-8M), a cada solución se le adicionó 0.2 mg/ml de proteína y se incubó en baño María 2h a 25°C para asegurar que se hubiera alcanzado el equilibrio. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se obtuvo el espectro de dicroísmo circular (CD) (200-260 nm) para monitorear los cambios en la estructura secundaria. La señal a 222 nm se utilizó para medir los cambios de estructura secundaria en función de la concentración de urea. La curva de desplegamiento al equilibrio obtenido mediante CD se normalizó como fracción aparente (F_{app}) utilizando la ecuación 1.

$$F_{app} = \frac{(y_{obs} - y_N)}{(y_D - y_N)} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde el parámetro y_{obs} es el valor de la proteína obtenido experimentalmente mediante CD, los valores y_N y y_D se obtienen de cualquier punto de la transición mediante la extrapolación lineal del estado de pretransición (estado nativo) y pos-transición (estado desplegado) ya que dependen de la concentración de desnaturalizante (Fig. 25) (**Pace, 1986**).

La curva de desplegamiento F_{app} se ajustó tanto a un modelo de 2 estados $N \leftrightarrow U$, como de 3 estados $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$ mediante el programa SAVUKA. Para un modelo de 2 estados la constante de equilibrio se expresa en relación a la fracción desplegada (f_u)



$$K_{NU} = \frac{U}{N} = \frac{f_u}{1 - f_u} \quad \text{Ec. 3}$$

Conociendo K es posible conocer el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG^0) que describe el proceso del estado nativo al desplegado como se describe en la ecuación 4

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{NU} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta. ΔG^0 es el cambio de energía asociado al proceso de desplegamiento. Con el incremento en la concentración de desnaturalizante, la relación del estado plegado y desplegado

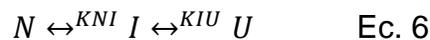
(constante de equilibrio) cambia de tal manera que a una concentración baja de urea la relación tiene un valor fraccional que provee un valor positivo a ΔG^0 en la conversión a energía en la ecuación, mientras que a altas concentraciones el valor de D/N se convierte en un número entero que convierte en un valor negativo ΔG^0 lo que indica la reacción espontánea de desplegamiento.

El punto medio en la región de transición es conocido como Cm o [Urea]50%. En este punto, la constante de equilibrio se convierte en 1 así que la población del estado plegado y desplegado es igual, por lo tanto, ΔG^0 se convierte en 0. Gracias a estudios previos se conoce que en el proceso de desnaturalización el cambio de energía libre de Gibbs varía de forma lineal con la concentración de desnaturalizante.

$$\Delta G^0 = \Delta G_{H_2O}^0 - m[Urea] = -RT \ln K \quad \text{Ec.5}$$

Donde $\Delta G_{H_2O}^0$ es ΔG^0 en ausencia del agente desnaturalizante y m es el valor de la dependencia de la constante de equilibrio asociada al proceso de desnaturalización con respecto a la concentración de desnaturalizante. La estabilidad estructural de la proteína se estimó extrapolando a 0 la concentración de desnaturalizante.

Por otro lado, también podemos considerar la existencia de un intermediario ajustando a un modelo de 3 estados como se muestra a continuación:



Donde K_{NI} es la constante de equilibrio entre el estado Nativo e Intermediario y K_{IU} es la constante de equilibrio entre el estado Intermediario y desplegado.

De manera que la fracción aparente de proteína desplegada está dada por la ecuación:

$$F_{app} = Z f_i + f_U \quad \text{Ec.7}$$

Donde f_i y f_U son las fracciones de la proteína en estado intermediario y desplegado, respectivamente y Z es el parámetro que define la señal de CD a 222 nm del intermediario, relativa al cambio entre el estado desplegado y el estado nativo.

Así, el cambio de señal aparente se ajusta a la siguiente ecuación de donde se pueden obtener las constantes de equilibrio para cada transición y a partir de éstas, los

parámetros termodinámicos del cambio de energía libre de Gibbs para cada una de las transiciones, ΔG° y su dependencia sobre la concentración de urea, m .

$$F_{app} = \frac{K_{NI}(K_{IU} + Z_I)}{1 + K_{NI}(1 + K_{IU})} \quad \text{Ec.8}$$

y donde cada una de las constantes de equilibrio se relacionan con la energía libre de Gibbs mediante las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G_{NI}^0 = \Delta G_{NI(H_2O)}^0 - m_{NI}[Urea] = -RTK_{NI} \quad \text{Ec.9}$$

Y,

$$\Delta G_{IU}^0 = \Delta G_{IU(H_2O)}^0 - m_{IU}[Urea] = -RTK_{IU} \quad \text{Ec.10}$$

5.10. Complementación de la actividad triosa fosfato isomerasa

Las variantes subclonadas en el vector pET22 se transformaron en la cepa auxótrofa *E. coli* ER Δ Tpi, a continuación, se realizó un precultivo de cada variante en medio LB+Ap 16h/37°C. A partir del precultivo se realizó un cultivo y se incubó a 37°C hasta llegar a una absorbancia de 0.4-0.6. Posteriormente cada cultivo se lavó 3 veces con medio M9 y se resuspendió en 1 mL de medio M9. Se ajustó cada cultivo a una D.O₆₀₀=0.3, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas desde 1x10² hasta 1x10⁶ UFC, de las cuales se gotearon 10 μ l en cajas de LB/Amp y M9/Amp para observar complementación de actividad. Las cajas de LB se incubaron durante 18h a 37°C, las cajas de M9 fueron incubadas durante 3 días a 37°C. Se utilizó el plásmido pET3a+MonoTIM como control positivo y pET22+Amy A como control negativo.

6. RESULTADOS

6.1. Clonación del gen yPRAI

Se amplificó el gen yPRAI de *Saccharomyces cerevisiae* mediante PCR utilizando los cebadores yPrai_NdeI_fw (GAATTCCATATGTCTGTTATTAATTTCACAG) y puc18_yPRArev (CGCCAGAAGCGGCCGCTTTCTTAGCATTTTTGACGAAATTTG) (**Fig. 11**) mismos que insertaron sitios de restricción *NdeI* y *NotI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, para posteriormente ser clonados en el vector pET22.

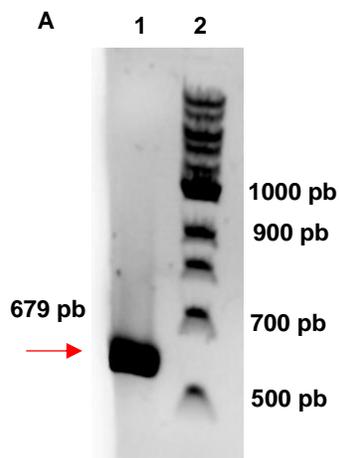


Fig. 11. Clonación Del gen yPRAI (trpC). **A)** Corrimiento electroforético del producto de PCR yPRAI. Carril 1 gen yPRAI, carril 2 Marcador de peso molecular de 1Kb.

6.2. Identificación de los sitios que delimitan subunidades de plegamiento en posiciones equivalentes entre las proteínas TIM y PRAI

Los sitios de plegamiento independiente utilizados para crear a las proteínas quimeras se identificaron bajo criterios específicos mencionados en la sección de Métodos, como resultado de este análisis se seleccionaron las posiciones que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Sitios seleccionados para generar las quimeras		
	TbMonoTIM	yPRAI
Hélice α_3	Leu76	Ala87
Hebra β_5	M115	Cys126
Asa $\alpha_2\beta_3$	Pro58, Lys59	Pro70, Lys71, Tyr72
Asa $\beta_4\alpha_4$	Gly96	Asp102, Glu103, Ser104

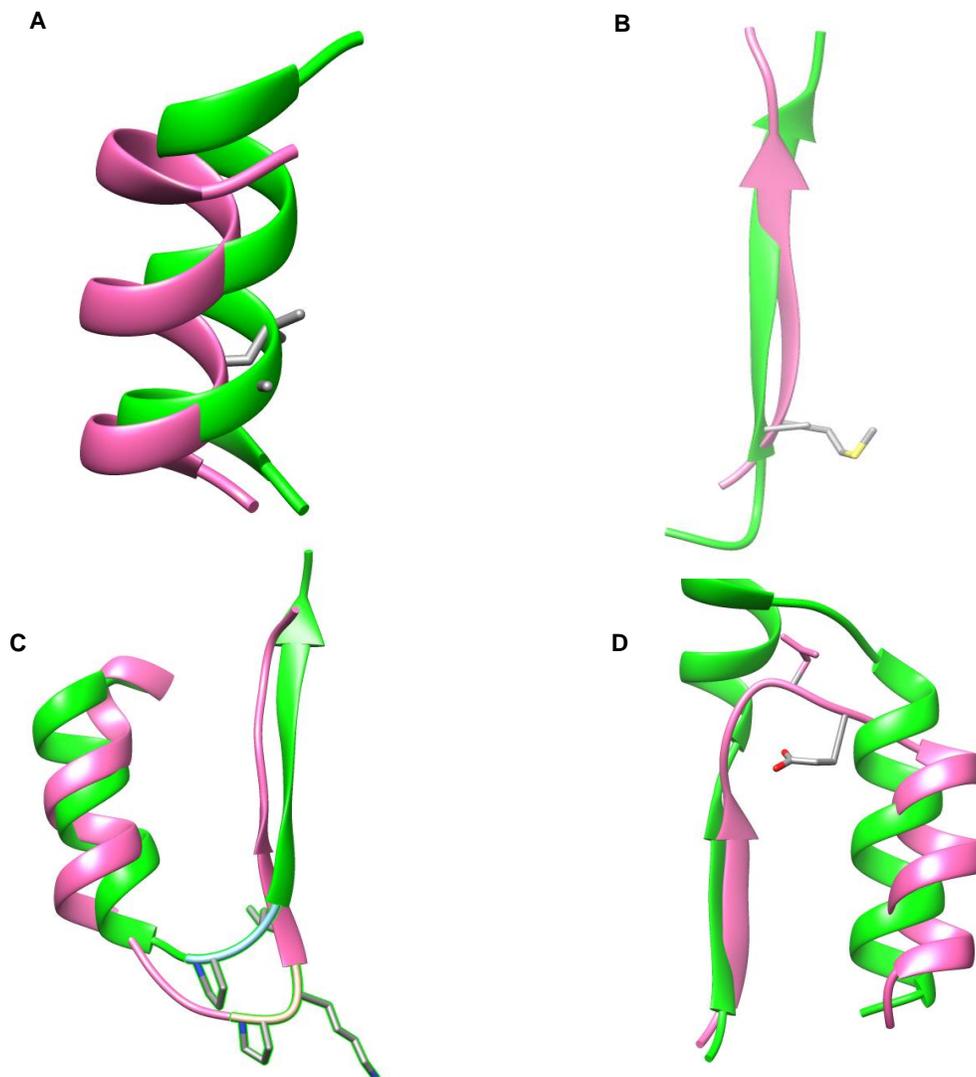


Fig. 12. Alineamiento estructural de TbMonoTIM (2WSR) y ePRAI (1PII) en rosa y verde respectivamente. Se muestran las estructuras secundarias en las cuales se identificaron módulos de plegamiento equivalentes en ambas proteínas. Las cadenas laterales de los residuos específicos se han representado con varillas.

6.3. Construcción de la proteína quimera con interfase en el asa $\alpha_2\beta_3$ Quimera asa $\alpha_2\beta_3$ MonoTIM5'/PRAI3'

Para la creación de la primera quimera se decidió comenzar con la región $\alpha_2\beta_3$ con el fragmento de MonoTIM en la parte 5' y PRAI en la 3'. Para amplificar la porción de MonoTIM se utilizaron los cebadores MON_EcoNde_F y TIMN_asa $\alpha_2\beta_3$ _Rv, para amplificar la porción de PRAI se utilizaron los cebadores TIMN_asa $\alpha_2\beta_3$ _Fw y PRAI_BamHI_R (**Fig.13A**).

6.3.1. Generación de la quimera mediante PCR por extensión de regiones sobrelapadas

Una vez obtenidos los fragmentos de los genes de MonoTIM y PRAI se realizó una segunda PCR, la cual constó de dos pasos. En el primer paso la reacción de PCR contenía sólo el templado (fragmentos MonoTIM y PRAI) sin los cebadores para que éstos hibridaran y elongara el gen quimera. Posteriormente y después de 9 ciclos de reacción se detuvo y se agregaron los cebadores que flanquean al gen quimera y se reanudó el proceso durante 20 ciclos más (**Fig. 13B**).

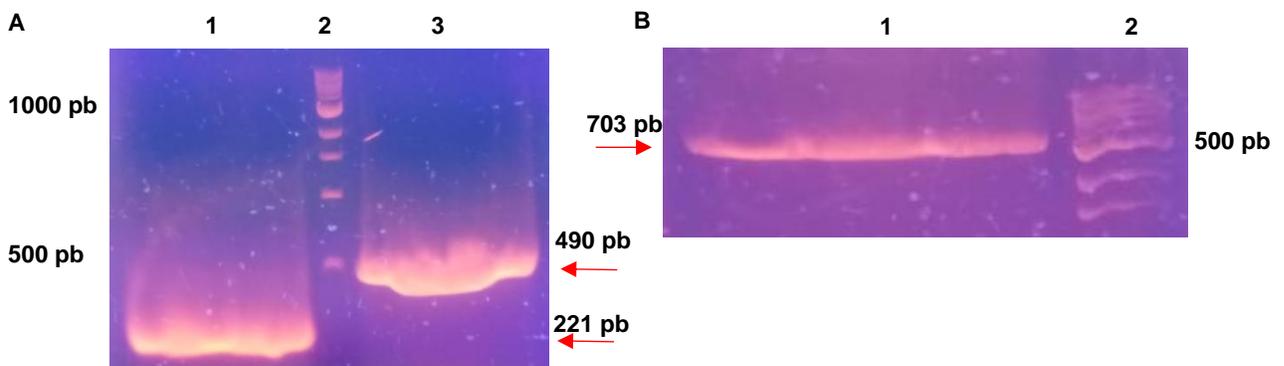


Fig. 13. Electroforesis en gel de agarosa. **A)** Carril 1, PCR para amplificar la región 5' del gen MonoTIM con los oligonucleótidos Mon_EcoNde_Fw y TIM_asa α 2 β 3_Rv; carril 2, marcador de peso molecular de 1Kb; carril 3, amplificación de la región 3' del gen yPRAI con oligonucleótidos TIM_asa α 2 β 3_Fw y PRAI_BamHI_Rv. Los productos obtenidos de estas reacciones se usaron para construir el gen quimera por PCR de extensión solapada. **B)** Carril 1, PCR utilizando los productos de PCR MonoTIM e yPRAI como molde de ADN con los oligonucleótidos Mon_EcoNde_Fw y PRAI_BamHI_Rv; carril 2, marcador de peso molecular de 1Kb.

Una vez obtenido el gen quimera se procedió a clonarlo en el vector de selección pUC-CAT y transformarlo en *E. coli* MC1061. Posteriormente usando las condiciones anteriormente mencionadas en material y métodos sobre la selección de variantes plegadas en la librería, de las colonias obtenidas de la transformación tomaron aproximadamente 600 colonias aisladas y se sembraron en una caja de LB+Ap y en otra de LB+Cm, en este proceso de selección se obtuvo una relación aproximada de 10% de colonias con crecimiento en cloranfenicol. Con este proceso de selección se seleccionaron 2 probables quimeras que mostraron crecimientos en ambas cajas (**Fig.**

14). Desafortunadamente, las 2 probables quimeras seleccionadas para secuenciar su DNA resultaron ser falsos positivos, ya que se observó la delección de una Citosina al inicio del gen en ambas clonas. En la fig. 13 se pueden observar los resultados de secuenciación, así como el reporte de síntesis del cebador MON_EcoNde_F, con ello podemos inferir que el origen del error se encontraba en el cebador, así que se desecharon todas las clonas y se reanudaron los ensayos ahora utilizando el fragmento 5' del gen PRAI y el fragmento 3' del gen MonoTIM, siguiendo con el mismo protocolo.

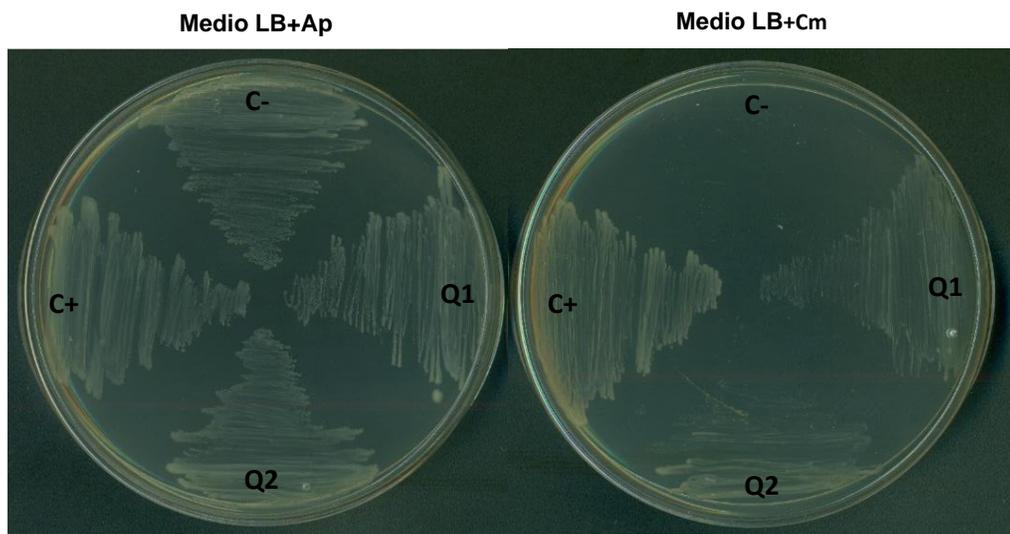


Fig. 14. Las células se sembraron en medio LB para comparar el crecimiento de las diferentes cepas. C+, Vector con reportero CAT, con MonoTIM; C-, Vector con reportero CAT, sin ORF; Q1, Q2, clonas con crecimiento en Cm.

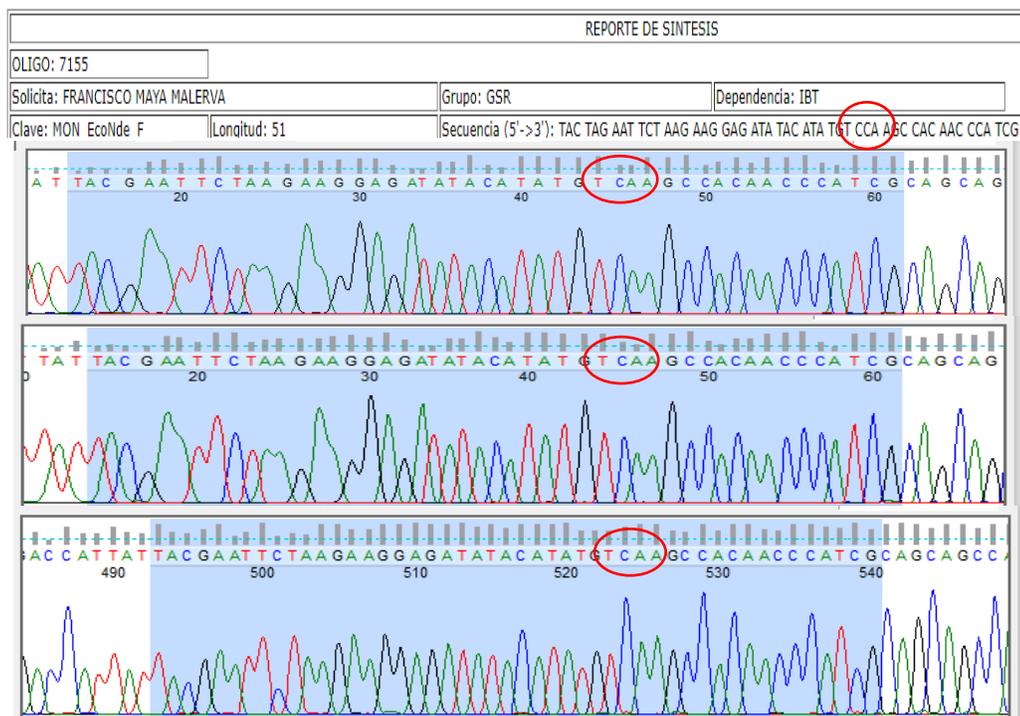


Fig. 15. Secuenciación de las probables quimeras. En círculos rojos se observa la comparación de la secuencia correspondiente al inicio del gen con el reporte de síntesis en donde se observa la omisión de una C. En las tres secuencias se resaltaron los nucleótidos correspondientes al oligonucleótido Mon_EcoNde_F.

6.3.2. Quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' (PaMc $\alpha_2\beta_3$)

Siguiendo el mismo protocolo que en la construcción anterior, primero se generaron los fragmentos de la región 5' y 3', en este caso tomando al gen yPRAI como región 5' y al gen MonoTIM como 3' (**Fig. 16A**), posteriormente y tomando a estos dos fragmentos como templado se generó el gen quimera PRAI5'/MonoTIM3' asa $\alpha_2\beta_3$ (PaMc $\alpha_2\beta_3$) (**Fig. 16B**).

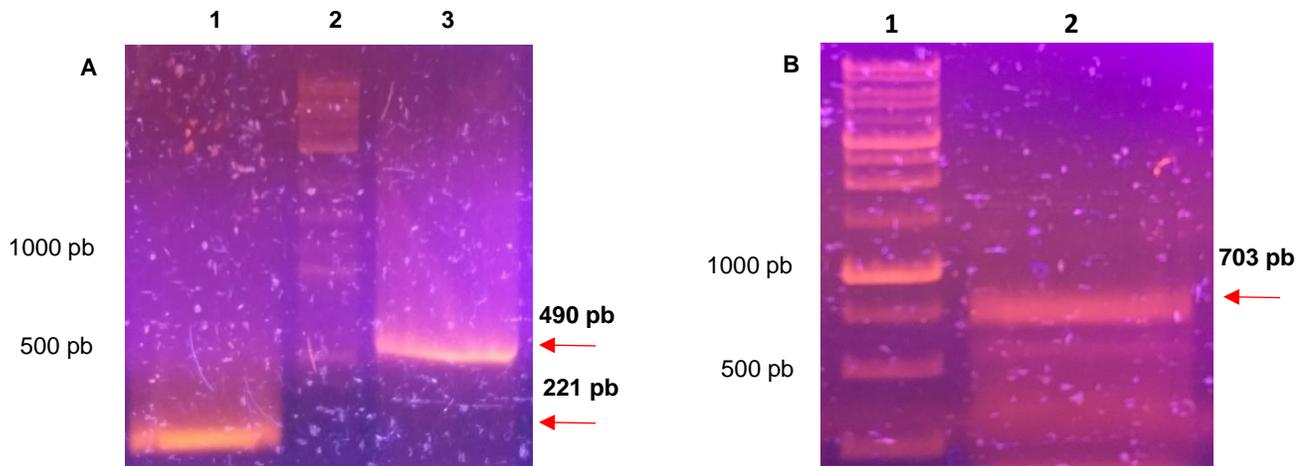


Fig. 16. Electroforesis en gel de agarosa. A) Carril 1, PCR para amplificar el gen yPRAI con los oligonucleótidos PRAI_EcoNde_Fw y PRAIN_asa α 2 β 3_Rv; carril 2, marcador de peso molecular de 1Kb; carril 3, amplificación del gen MonoTIM con oligonucleótidos PRAIN_asa α 2 β 3_Fw y Mon_BamHI_Rv. Los productos obtenidos de estas reacciones se usaron para construir el gen quimera por PCR de extensión de solapamiento. B) Carril 1, marcador de peso molecular de 1Kb; carril 2, PCR utilizando los productos de PCR MonoTIM e yPRAI como molde de ADN con los oligonucleótidos PRAI_EcoNde_Fw y Mon_BamHI_Rv.

Finalmente, en la figura 15 se puede observar que aproximadamente 45 % de las clonas tenían resistencia a cloranfenicol y por lo tanto eran potencialmente capaces de plegarse. De las colonias obtenidas en la transformación y sembradas en el medio de selección se obtuvieron varias posibles quimeras (**Fig. 17**), de las cuales se tomaron al azar 20 para realizarles PCR de colonia utilizando los cebadores PRAI_EcoNde_F y CAT_5_Rv. Se obtuvieron 9 colonias con amplificado en el peso esperado (**Fig. 18**), de las cuales 5 se seleccionaron para secuenciar.

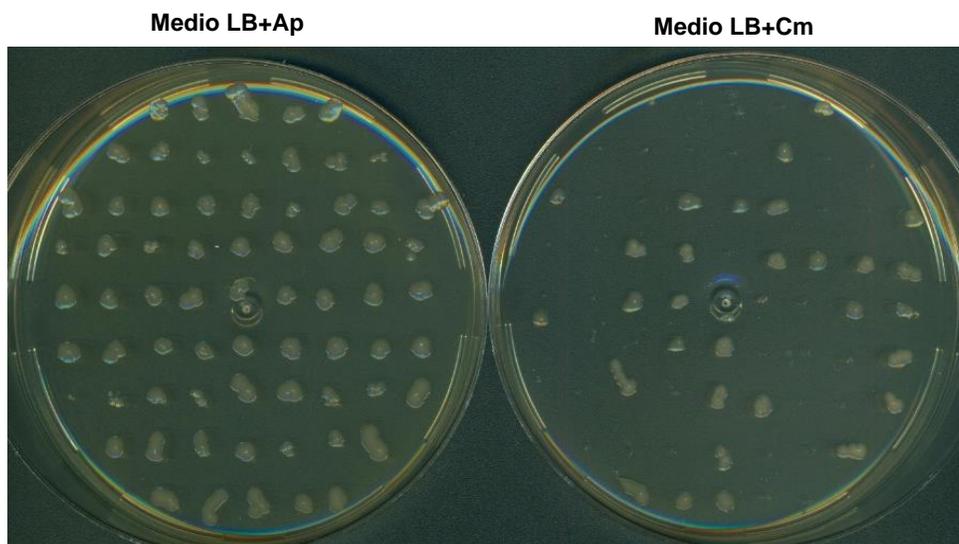


Fig. 17. Células *E. coli* MC1061 transformadas con el plásmido pUC-CAT+PaMc $\alpha_2\beta_3$ sembradas en medio LB+Ap y en el medio de selección LB+Cm.

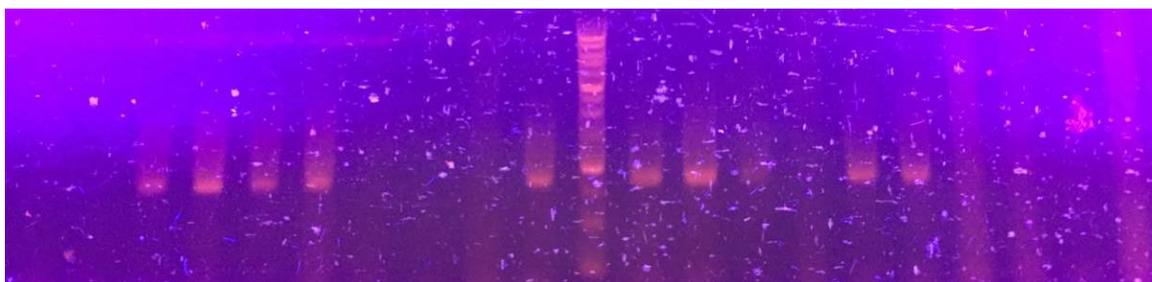


Fig. 18. PCR de colonia. Se tomaron 20 colonias que presentaron crecimiento en Cm y se utilizaron los oligonucleótidos específicos para la región PRAI 5' y CAT, PRAI_EcoNde_F y CAT_5_Rv, respectivamente.

De la biblioteca de quimeras PaMc $\alpha_2\beta_3$ crecidas en medio con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cm se realizó una segunda selección de variantes sembradas en LB/50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm. Después de 14h se observó un poco de crecimiento en las cajas con LB/50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm (**Fig. 19**), se seleccionaron 5 colonias en las cuales, mediante PCR se comprobó la presencia del fragmento de tamaño esperado y posteriormente se secuenciaron.

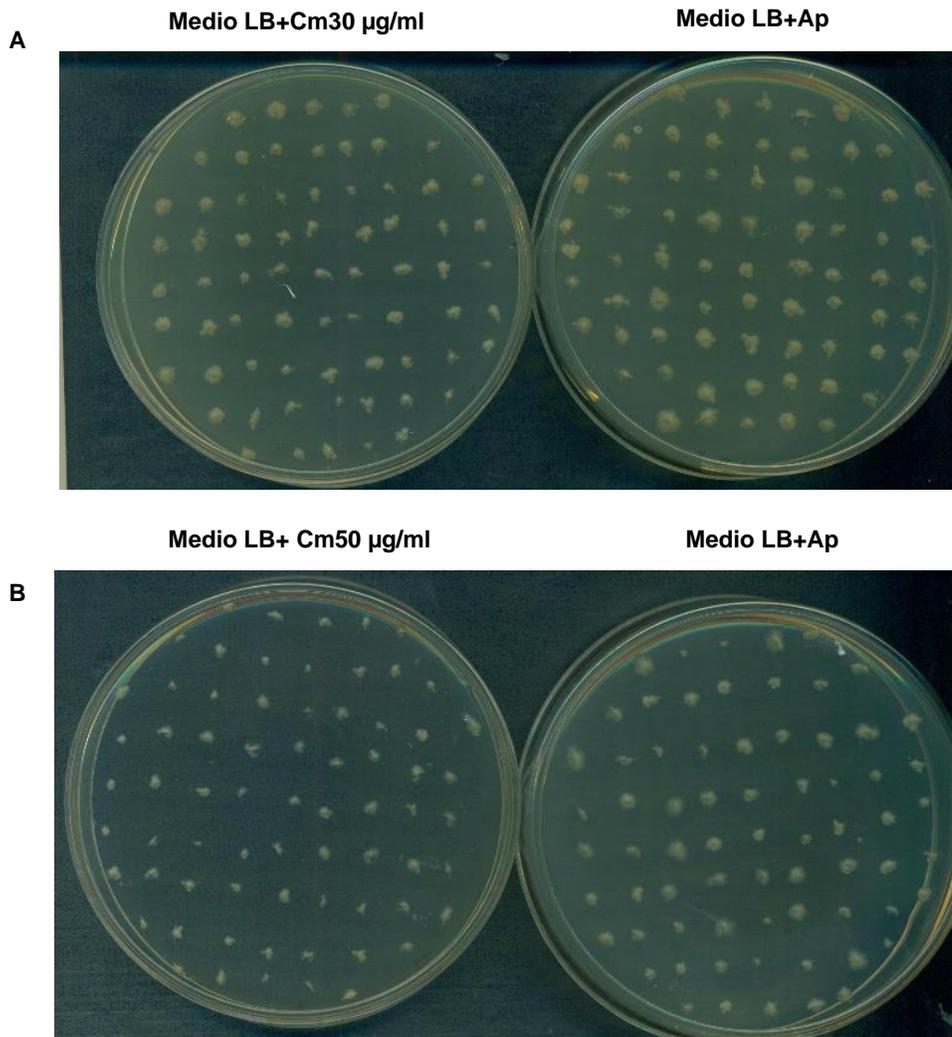


Fig. 19. Selección de colonias en LB/Cm a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$. Se tomaron aquellas colonias que mostraban crecimiento en Cm. Se seleccionaron 5 colonias para ser secuenciadas.

Las secuencias de las quimeras que crecieron en el medio con Cm muestran, en efecto, la región N-terminal de la enzima PRAI y la región C-terminal de MonoTIM. Por otro lado, y de acuerdo al diseño, la región de dos aminoácidos que conecta a ambas partes de la quimera varía en cada construcción. A pesar de que es una muestra pequeña, se muestra una preferencia por arginina, presente en 3 quimeras; metionina, presente en 2 quimeras; y glicina, presente en dos quimeras (**Fig. 20**).

```

Sec      MSVINFTGSSGPLVKVCGLQSTEAEECALDSADLLGII CVPNRKRTIDPVIARKISSLV 60
RS       MSVINFTGSSGPLVKVCGLQSTEAEECALDSADLLGII CVPNRKRTIDPVIARKISSLV 60
PR       MSVINFTGSSGPLVKVCGLQSTEAEECALDSADLLGII CVPNRKRTIDPVIARKISSLV 60
MR       MSVINFTGSSGPLVKVCGLQSTEAEECALDSADLLGII CVPNRKRTIDPVIARKISSLV 60
MG       MSVINFTGSSGPLVKVCGLQSTEAEECALDSADLLGII CVPNRKRTIDPVIARKISSLV 60
GH       MSVINFTGSSGPLVKVCGLQSTEAEECALDSADLLGII CVPNRKRTIDPVIARKISSLV 60
*****

Sec      KAYKNSSGTF--VIAAQNAGNADALASLKDFGVNWIIVLGHSERRAYYGETNEIVADKVA 118
RS       KAYKNSSGTRSVIAAQNAGNADALASLKDFGVNWIIVLGHSERRAYYGETNEIVADKVA 120
PR       KAYKNSSGTPRVIAAQNAGNADALASLKDFGVNWIIVLGHSERRAYYGETNEIVADKVA 120
MR       KAYKNSSGTFMVIAAQNAGNADALASLKDFGVNWIIVLGHSERRAYYGETNEIVADKVA 120
MG       KAYKNSSGTFMVIAAQNAGNADALASLKDFGVNWIIVLGHSERRAYYGETNEIVADKVA 120
GH       KAYKNSSGTFMVIAAQNAGNADALASLKDFGVNWIIVLGHSERRAYYGETNEIVADKVA 120
*****

Sec      AVASGFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLTIAAIAKLLKADWAKVVIAYEPVWAI 178
RS       AVASGFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLTIAAIAKLLKADWAKVVIAYEPVWAI 180
PR       AVASGFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLTIAAIAKLLKADWAKVVIAYEPVWAI 180
MR       AVASGFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLTIAAIAKLLKADWAKVVIAYEPVWAI 180
MG       AVASGFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLTIAAIAKLLKADWAKVVIAYEPVWAI 180
GH       AVASGFMVIACIGETLQERESGRTAVVVLTIAAIAKLLKADWAKVVIAYEPVWAI 180
*****

Sec      KVATPQQAQETHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGG 238
RS       KVATPQQAQETHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGG 240
PR       KVATPQQAQETHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGG 240
MR       KVATPQQAQETHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGG 240
MG       KVATPQQAQETHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGG 240
GH       KVATPQQAQETHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGG 240
*****

Sec      ASLKPEFVDIIKATQ 253
RS       ASLKPEFVDIIKATQ 255
PR       ASLKPEFVDIIKATQ 255
MR       ASLKPEFVDIIKATQ 255
MG       ASLKPEFVDIIKATQ 255
GH       ASLKPEFVDIIKATQ 255
*****

```

Fig. 20. Alineamiento múltiple de las quimeras con respecto a la secuencia original de la construcción (a la cual se le omiten los 2 aminoácidos de la unión de ambas regiones). En un recuadro negro se resaltan los aminoácidos que generan la interfase de las quimeras.

6.4. Expresión y purificación de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' PaMc $\alpha_2\beta_3$

Los 5 genes que codifican para las proteínas quimeras seleccionadas en Cm y confirmadas por secuenciación fueron subclonados en el vector de expresión pET22 y nuevamente validadas por PCR con los cebadores PRAI_EcoNde_F y Mon_BamHI_Rv. Posteriormente se secuenciaron para comprobar que el marco de lectura estuviera en fase con la etiqueta de poli Histidinas la cual permitiría la purificación. Se obtuvieron 3 quimeras en el marco de lectura correcto (variantes GH, MR y RS), de las cuales se realizó un pequeño ensayo para determinar si las proteínas se encontraban solubles o en cuerpos de inclusión (**Fig. 21**).

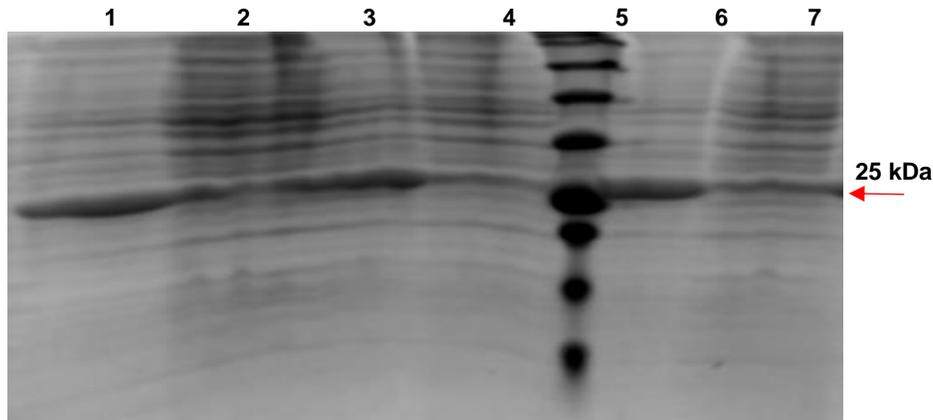


Fig. 21. Expresión de tres variantes de la proteína quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' en la cepa de expresión *E. coli* ER con 0.3 mM de IPTG. **1)** GH PP, **2)** GH PS, **3)** MR PP, **4)** MR PS, **5)** MPM, **6)** RS PP, **7)** RS PS. Se observan las proteínas quimera sobreexpresada en la fracción de proteínas precipitadas. Con la flecha se señala la banda de 25 kDa del marcador de PM. **PP**, proteína precipitada; **PS**, proteína soluble.

Se observó que una pequeña fracción de la proteína expresada se encontraba en la fracción soluble y la mayoría en la fracción insoluble, por lo que para descartar que la sobreexpresión a la concentración de IPTG empleada, 0.3 mM favorece la formación de cuerpos de inclusión, se realizaron otros cultivos de una sola variante (RS) a diferentes concentraciones de IPTG: 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 mM. Se agregó el IPTG cuando el cultivo alcanzó una Abs de 0.4 y se incubó toda la noche a 18°C, posteriormente se lisaron las células mediante sonicación. Pese a ello aún se observó a la mayoría de la proteína expresada en la fracción insoluble (**Fig. 22**).

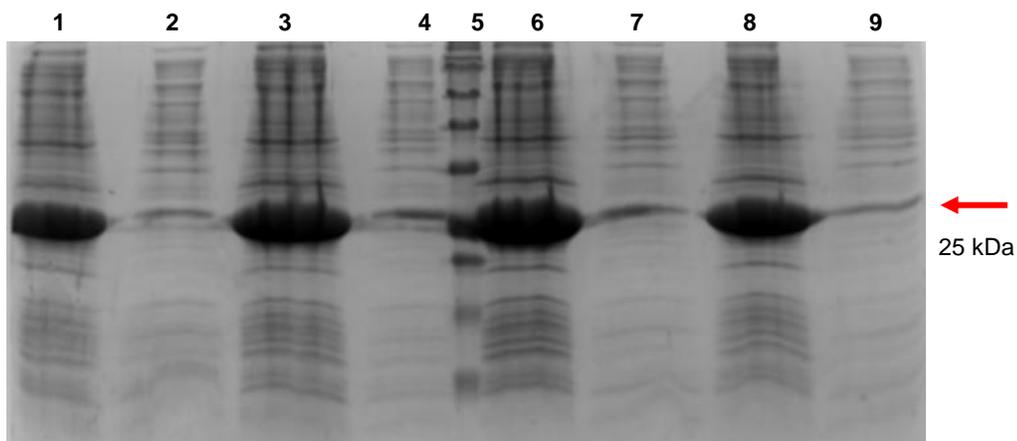


Fig. 22. SDS-PAGE de la quimera RS en la cepa ER de *E. coli*. **1)** 0.05 mM PP, **2)** 0.05 mM PS, **3)** 0.1 mM PP, **4)** 0.1 mM PS, **5)** MPM, **6)** 0.15 mM PP, **7)** 0.15 mM PS, **8)** 0.2 mM PP, **9)** 0.2 mM PS. Se observa una gran cantidad de proteína en el pellet (PP), sin embargo, también se observa un poco en la fracción soluble (PS).

Debido a que la proteína se observó en mayor cantidad en la fracción precipitada se procedió a seguir el protocolo para recuperarla de los cuerpos de inclusión. Puesto que entre las tres variantes no se observó un cambio significativo en la expresión de la proteína quimera, se eligió una al azar para proseguir con la purificación y caracterización la quimera PaMc $\alpha_2\beta_3$ GH. La quimera variante GH fue sobreexpresada utilizando 0.1 mM de IPTG, la proteína obtenida en los cuerpos de inclusión se recuperó utilizando urea como desnaturizante y posteriormente se replegó en buffer de fosfatos que contenía arginina 1 M. Lamentablemente al momento de dializar para retirar la Arg la pérdida de fuerza iónica provocó que gran parte de la proteína se agregara. No obstante, se pudo recuperar una buena cantidad de proteína soluble después de la diálisis la cual finalmente se purificó mediante cromatografía de afinidad a Ni^{2+} (**Fig. 23**).

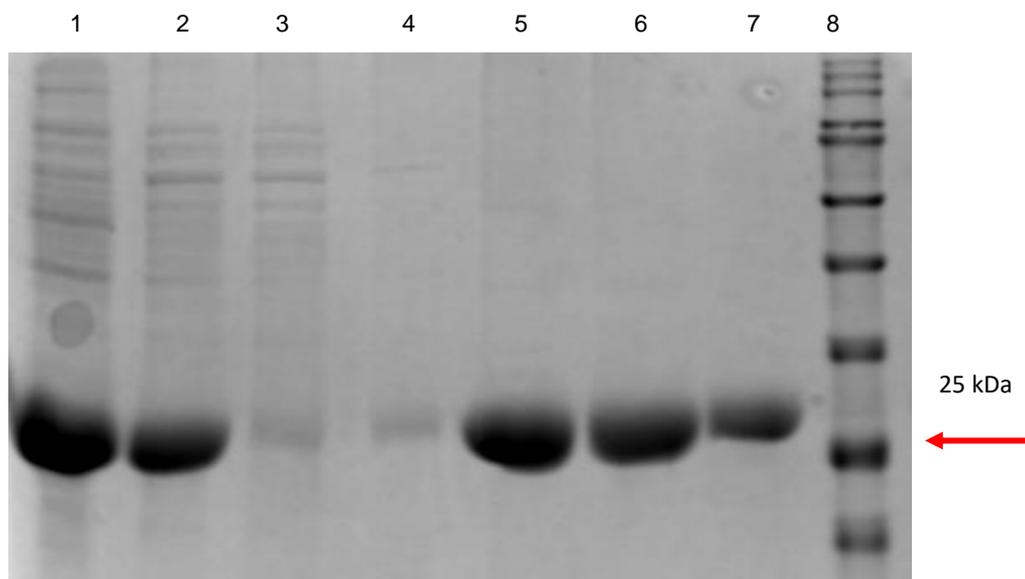


Fig. 23. Purificación de la proteína quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' variante GH en la cepa de expresión *E. coli* ER. **1)** Proteína precipitada (en diálisis), **2)** Proteína soluble (después de diálisis), **3)** Proteína no unida, **4)** Proteína eluida con 15mM de imidazol, **5-7)** Proteína eluida con 100mM de imidazol, **8)** Marcador de PM. Con la flecha se señala la banda de 25 kDa del marcador de PM.

6.5. Caracterización de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' variante GH

Para tener certeza de que la proteína replegada a partir de cuerpos de inclusión de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' variante GH realmente se plegó, y hacer una

estimación de su contenido de estructura secundaria se obtuvo un espectro de dicroísmo circular (CD) en la región de UV lejano a 25°C (Fig.20). El espectro de la proteína quimera muestra dos valores mínimos a 210 nm y 220 nm característicos de proteínas que contienen hélices y compatibles con el de proteínas con plegamiento de barril ($\beta\alpha$)₈ (Zomosa-Signoret *et al.*, 2003). El espectro de CD se analizó mediante el servidor Bestsel para determinar el porcentaje de elementos de estructura secundaria, obteniéndose 62.5% de hélices, 16.2% de hebras y 21.4% de otros elementos, valores muy parecidos a los de MonoTIM (Fig. 24).

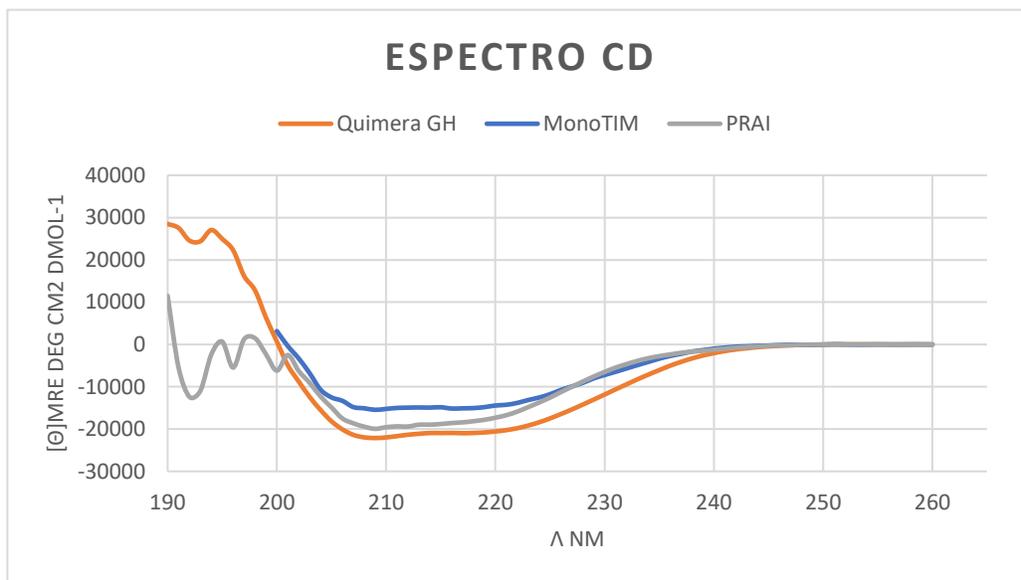


Tabla 5. CONTENIDO ESTIMADO DE SS (%)

	Quimera	PRAI	MonoTIM
Hélices	62.5	55	69.5
Hebras	16.2	43	16
Otros	21.4	1.8	15.5

Fig. 24. Espectro de CD de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' variante GH, MonoTIM y yPRAI. La composición de la estructura secundaria fue calculada con el servidor Bestsel.

6.5.1. Desplegamiento térmico

Con la finalidad de determinar si la estructura observada, realmente corresponde a una proteína que tenga un plegamiento cooperativo, se determinó la estabilidad térmica de la proteína quimera mediante el registro de la pérdida de señal de CD a 222 nm con el incremento de la temperatura (**Fig. 25**). La curva de pérdida de elipticidad muestra un despliegamiento cooperativo e irreversible que se ajusta a un modelo de 2 estados (N < - > U) con una temperatura media de desnaturalización (T_m) de 41.8°C, el cual no está tan alejado de la T_m de las proteínas TbMonoTIM y yPRAI de las cuales se generó la quimera con una T_m de 38°C (**Borchert et al., 1993a**) y 43°C (**Patrick y Blackburn, 2005**), respectivamente. La falta de reversibilidad impide determinar parámetros termodinámicos.

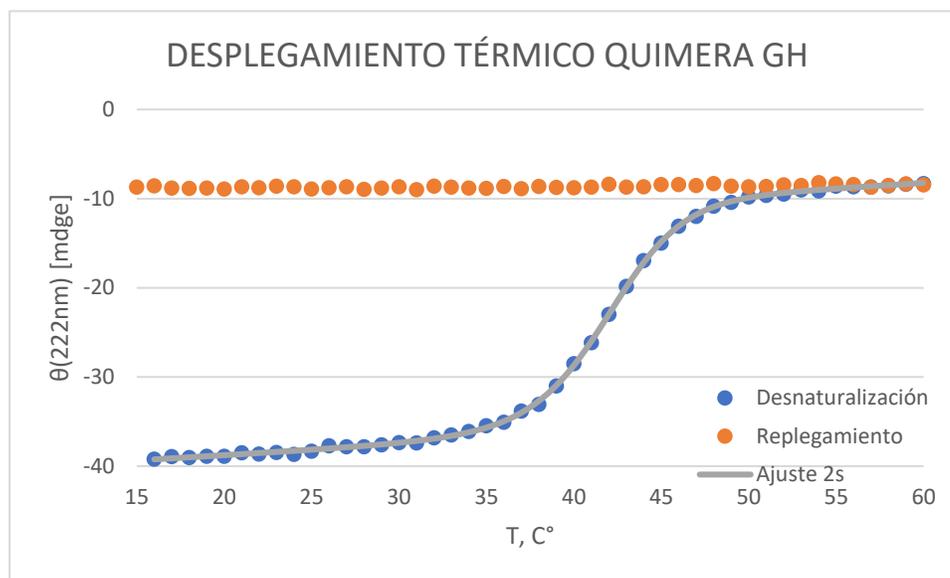


Fig. 25. Estabilidad térmica de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' GH. Se utilizaron 0.62 mg/mL de proteína y se monitoreó a 222 nm. Se graficó la elipticidad medida en mdeg contra el aumento de temperatura. La curva fue ajustada a un a un modelo de dos estados (N \rightarrow U). El valor de T_m obtenido fue de 41.8°

6.5.2. Desplegamiento con Urea

Se determinó la estabilidad de la quimera PaMc $\alpha_2\beta_3$ GH mediante un ensayo de despliegamiento con urea en condiciones de equilibrio. Se registró la pérdida de señal

mediante CD a 222 nm que acontecía con el aumento de la concentración de urea en el medio (0-8M) (**Fig. 26**).

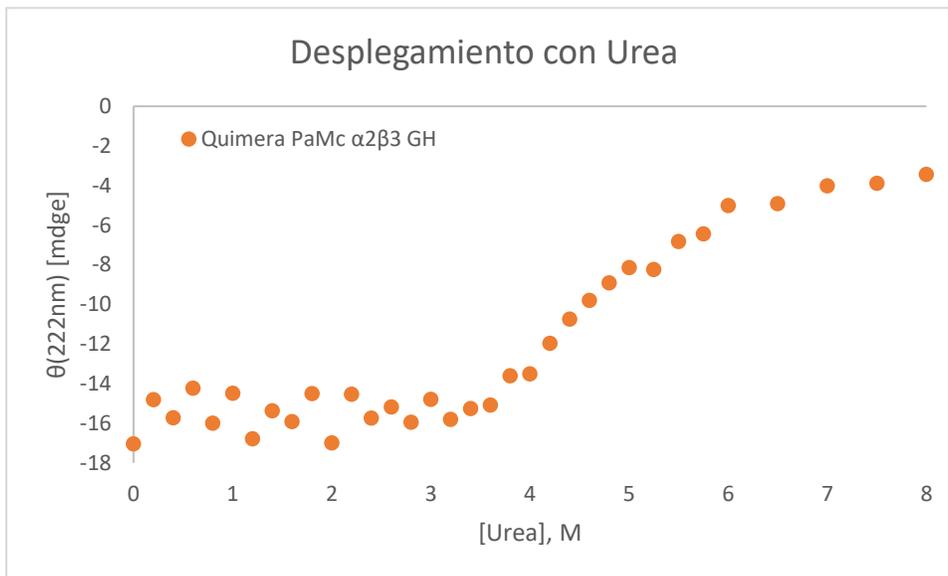


Fig. 26. Desplegamiento de la proteína quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' GH en presencia de urea. Se utilizaron 0.2 mg/mL de proteína y se monitoreó a 222 nm. Se graficó la elipticidad medida en mdeg contra el aumento de [urea].

No obstante, se debe tomar en cuenta que estos resultados son producto de un experimento único debido a las restricciones de tiempo de trabajo en el laboratorio impuestas por la pandemia de COVID-19 y a que la proteína tenía una fuerte tendencia a precipitarse al concentrarla arriba de 1 mg/mL. Asimismo, es importante considerar que debido a que la proteína plegada fue obtenida a partir de cuerpos de inclusión, en presencia de 9 M urea, la reversibilidad del desplegamiento queda implícito.

La curva de desplegamiento Fapp se ajustó tanto a un modelo de 2 estados $N \rightleftharpoons U$, como de 3 estados $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$ mediante el programa SAVUKA. La línea roja es el ajuste a un modelo de dos estados, mientras que la línea gris considera un equilibrio con la existencia de un intermediario (**Fig. 27**).

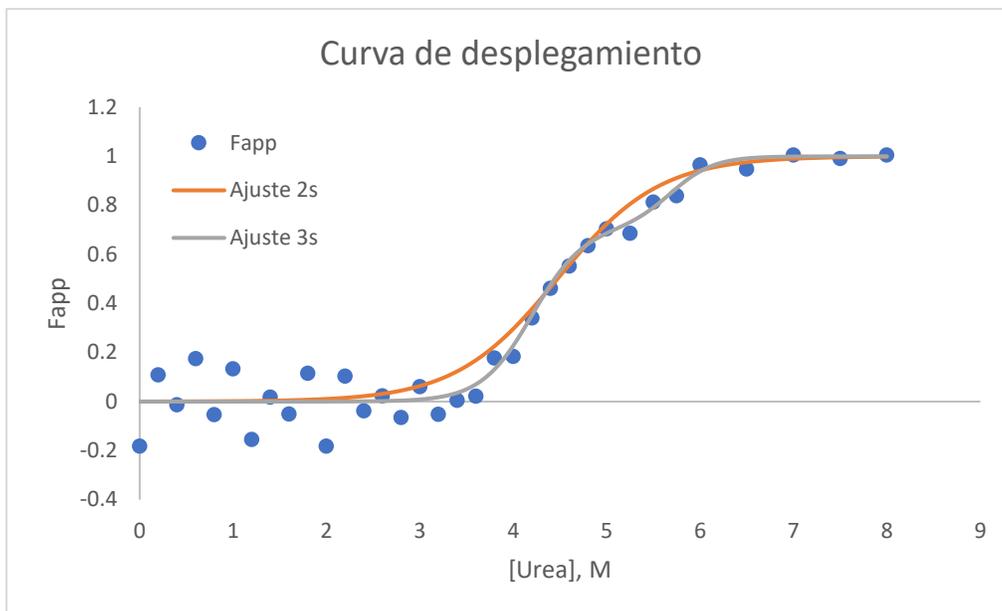


Fig. 27. Estabilidad en urea de la quimera asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' GH. Se utilizaron 0.2 mg/mL de proteína y se monitoreó a 222 nm. Se normalizó como Fapp y se graficó contra el aumento de [urea]. La curva fue ajustada a un a un modelo de dos ($N \rightarrow U$) y tres estados ($N \rightarrow I \rightarrow U$).

Como se puede observar en la Figura 26, el modelo que mejor se ajusta a los datos obtenidos es aquel que presenta un intermediario durante la reacción de desplegamiento. Los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 5. Este es un resultado esperado ya que en otros barriles TIM como la subunidad alfa de Triptófano sintetasa (**Crisanti y Matthews, 1981**), PRAI (**Jasanoff *et al.*, 1997**) e IGPS (**Sánchez del Pino y Fersht, 1997**) también se ha reportado la presencia de intermediarios. En el caso de esta quimera sería posible que lo observado en el intermediario corresponda al plegamiento de una de las fracciones de una de las proteínas y que la otra menos estable se pliegue posteriormente.

Tabla 6. Parámetros termodinámicos determinados mediante ensayos de desplegamiento

Proteína	ΔG^0 (kcal mol ⁻¹)	m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)
GH (N ->U)	6.74 (± 2.1)	1.58 (± 0.5)
GH (N->I)	9.04 (± 4.1)	2.15 (± 1.02)
GH (I->U)	14.59 (± 17.9)	2.56 (± 3.04)
MonoTIM (N->U)¹	5.11 (± 0.30)	1.26 (± 0.07)
PRAI (N->I)²	2.79	1.32
PRAI (I->U)²	4.44	1.02

1.- Tomado de Damián-Almazo, datos no publicados.

2.-Tomado de Akanuma y Yamagishi, 2005.

6.5.3. Ensayo de complementación de la actividad triosafosfato isomerasa

Debido a que la proteína quimera PaMc $\alpha_2\beta_3$ presenta la región C-terminal de MonoTIM, que en principio contendría los residuos catalíticos de TIM, se realizó un ensayo de complementación para descartar la actividad de triosafosfato isomerasa. Las quimeras se clonaron en la cepa auxótrofa *E. coli* ER ΔTpi , la cual nos permite, en medio mínimo, discriminar la presencia de actividad mediante el crecimiento de colonias bacterianas. Sin embargo, cabe resaltar que para obtener resultados fiables de complementación en esta cepa se debe de trabajar con una densidad celular baja, ya que se ha observado que, en presencia de una alta densidad bacteriana, algunas bacterias son capaces de formar colonias, supliendo la deficiencia de gliceraldehído-3-P a partir de las células muertas.

Después de 18h de incubación en medio LB (**Fig. 28A**) se puede observar crecimiento en tanto en las variantes y controles positivo y negativo, así como en sus respectivas diluciones seriadas. Por otro lado, en el medio mínimo de selección M9 (**Fig. 28B**), pese a que se incubó durante tres días, sólo se observa crecimiento uniforme en la primera fila de las quimeras concentradas, incluso en el control negativo que contiene el gen de la α -amilasa, sin embargo, en cuanto se hacen diluciones se deja de observar la complementación (**Fig. 28**). Finalmente, es interesante mencionar que los primeros

tres carriles correspondientes a las quimeras RS, MR y KK al menos en la primera dilución plaqueada se observan algunas colonias, contrario al cuarto carril y al control negativo.

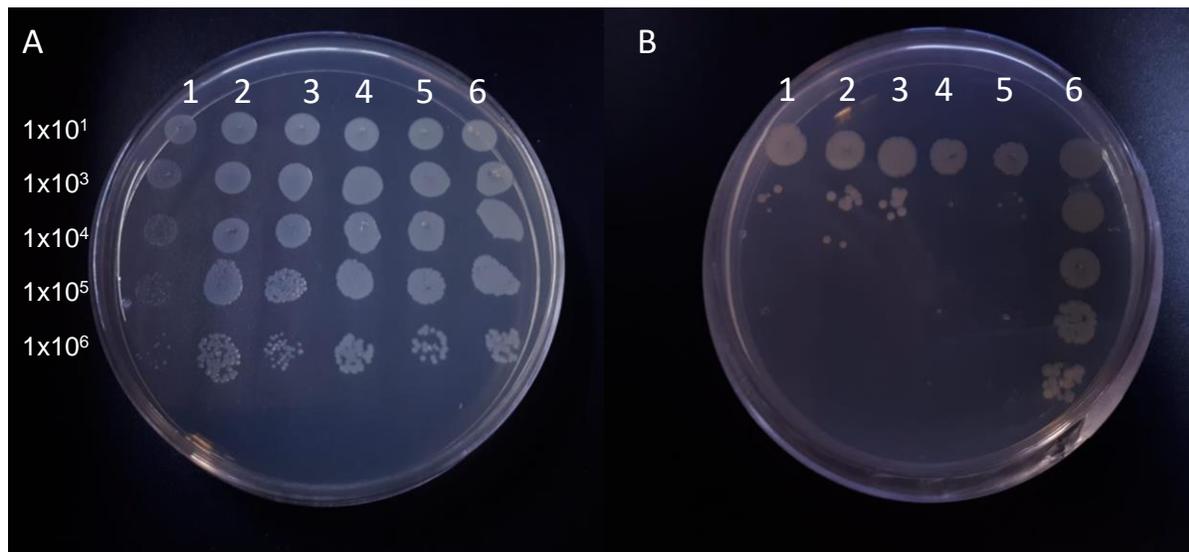


Fig. 28. Complementación de actividad en la cepa auxótrofa *E. coli* ER Δ Tpi en medio LB (caja A) y medio mínimo M9 (caja B). Las cajas de LB se incubaron durante 18h/37°, las cajas de M9 fueron incubadas durante 3 días/37°. Las quimeras y Amy A están clonadas en pEt-22, mientras que MonoTIM se encuentra en pEt-3a. **1)** Quimera RS, **2)** Quimera MR, **3)** Quimera KK, **4)** Quimera GH, **5)** Amy A (Control -), **6)** MonoTIM (Control +).

7. DISCUSIÓN

En la construcción del gen quimérico se insertó la secuencia NNG/C en la interfase del gen, con la finalidad de seleccionar los conectores más apropiados para un correcto plegamiento. Para seleccionar aquellas quimeras con plegamiento se utilizó el reportero CAT, del cual se ha reportado un cribado eficiente cuando se utiliza la cepa *E. coli* MC1061 ya que no presenta falsos positivos en un medio con cloranfenicol [20 μ g/mL] (Ochoa-Leyva *et al.*, 2009).

Para la expresión del gen quimérico, éste se subclonó en un vector de expresión que adicionó una etiqueta de polihistidinas. Sin embargo, la proteína sobreexpresada tuvo que ser recuperada de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en urea y fueron replegados en presencia de Arg.

Antes y después de la purificación la proteína fue dializada, primero para retirar la arginina y posteriormente para retirar el imidazol. En cada uno de estos pasos hubo formación de agregados de proteínas. Lo que, aunado a la presencia de estas proteínas en los cuerpos de inclusión, nos indica la poca estabilidad de la proteína quimera.

Los fragmentos utilizados para la construcción de la quimera pertenecen a 2 familias de proteínas distintas, no obstante, la proteína quimera obtenida se pliega correctamente lo que indica que los elementos que la conforman tienen la capacidad de plegarse independientemente. Sin embargo, la proteína resultante tiende a formar agregados, debido probablemente a que la interfase no es óptima y debe ser mejorada para conseguir una proteína más competitiva en el repliegamiento.

A pesar de que la interfase de la quimera caracterizada no es la óptima, los ensayos de desnaturalización térmica demuestran un desplegamiento cooperativo. Por otro lado, en los ensayos de desnaturalización con urea se observó la presencia de un intermediario, lo cual no es inesperado ya que a pesar de que son proteínas de un solo dominio se han reportado intermediarios estables en otros barriles TIM, incluyendo las proteínas con las cuales generamos las quimeras. Este intermediario visible durante el desplegamiento nos indica que los subdominios que integran a nuestra proteína quimera se pliegan de manera independiente. Sería muy interesante determinar si estos corresponden a los fragmentos provenientes de cada enzima.

Es necesario resaltar que, aunque el desplegamiento térmico generalmente se presenta sin intermediarios, esta quimera ha sido construida a partir de la unión de subunidades de plegamiento independiente y los resultados de la desnaturalización obtenidos nos sugieren una proteína con estructura compacta. Y si bien, se ha logrado generar quimeras plegadas con estructura de barril ($\beta\alpha$)₈ a partir de proteínas que contienen subdominios $\beta\alpha$ que difieren del barril TIM (plegamiento similar a flavodoxina), estas quimeras exploran la unión de las proteínas parentales sólo como medios barriles **(Bharat *et al.*, 2008; Eisenbeis *et al.*, 2012; Shanmugaratnam *et al.*, 2012).**

Finalmente, se ha reportado la construcción de proteínas quimeras que presentan actividad enzimática, no obstante, las proteínas parentales de las que se parte deben poseer alta homología de secuencia y estructura. Las enzimas quimeras que se han

construido exhiben una estructura compacta, sin embargo, algunas de ellas necesitan varias rondas de evolución dirigida para obtener alguna actividad significativa (**Smith et al., 2012; Sharma et al., 2016; Zheng et al., 2018**). En síntesis, aquellas proteínas parentales que conforman a las enzimas quimeras activas pertenecen a la misma familia y contienen en cierto grado un sitio activo conservado, mientras que MonoTIM y yPRAI pertenecen a familias distantes que sólo comparten cierta similitud en la posición de su sitio de unión a fosfato (**Nagano et al., 2002**). Por ello conseguir una quimera generada a partir de núcleos de plegamiento independiente con presencia de actividad era poco probable, ya que si bien, en nuestra construcción se mantuvieron los dos residuos pertenecientes al fragmento de MonoTIM que actúan como ácido (H95) y base (E167) en la catálisis, no se encuentran aquellos que estabilizan al intermediario (N11 y K13) y aunque algunos residuos de la misma naturaleza pueden encontrarse en la región equivalente del fragmento de yPRAI, es improbable que la posición de estos residuos permita la correcta formación de interacciones no covalentes que lleven a cabo la catálisis puesto que el sitio activo de cada proteína está adaptado para estabilizar a su propio sustrato y el DHAP y PRA difieren mucho en su estructura y mucho más en su volumen. Sin embargo, a pesar de que el ensayo de complementación en medio mínimo parece indicar que las quimeras formadas carecen de actividad, es de llamar la atención el comportamiento de las quimeras RS, MR y KK, en las que en contraste con la quimera GH y las bacterias transformadas con un vector portando el gen de una α -amilasa, si presentan colonias que alcanzaron un tamaño considerable en las primeras diluciones. Como se señaló anteriormente, la complementación de esta cepa debe observarse en suspensiones celulares diluidas, pero el comportamiento diferencial de estas tres construcciones pudiera deberse a la presencia de actividad residual, algo que sería necesario demostrarse mediante ensayos *in vitro*.

8. CONCLUSIONES

Las proteínas MonoTIM y PRAI presentan subunidades de plegamiento independiente equivalentes que, a pesar de no compartir identidad en su secuencia tienen la capacidad de formar una proteína plegada, en presencia y ausencia del reportero CAT, sin la necesidad de optimizar la interface. Aunado a esto, la interfase de esta construcción,

PaMc $\alpha_2\beta_3$, se da en una de las asas $\alpha\beta$, las cuales se han clasificado como responsables de la estabilidad del barril $(\beta\alpha)_8$.

La quimera del asa $\alpha_2\beta_3$ PRAI 5'/MonoTIM 3' variante GH presenta estabilidad térmica similar a las proteínas de las cuales deriva, así mismo se observa un desplegamiento cooperativo.

Este proyecto demuestra que se puede ensamblar una proteína estable a partir de fragmentos con plegamiento autónomo que, aunque pudieran provenir de proteínas que tuvieron un origen común, han divergido a tal punto que no es posible identificar homología alguna. Estos fragmentos expresan la estructura que debe tener el núcleo del barril para poder ensamblarse a pesar de no tener una interface optimizada.

La estabilidad del plegamiento $(\beta\alpha)_8$ permite la construcción de quimeras que presentan plegamiento a pesar de proceder de enzimas sin identidad de secuencia. Lo que nos permite inferir que, si eventos de recombinación genética insertan módulos de plegamiento independiente en un correcto marco de lectura, es probable que se obtengan proteínas con plegamiento compacto. Y si esto es posible con un solo subdominio podríamos deducir que, varios procesos de recombinación y/o duplicación podrían haber dado lugar a topologías repetitivas y simétricas.

En este trabajo se sustituyeron subunidades equivalentes en cuanto a su posición en la estructura, sin embargo, en la naturaleza también existen claros ejemplos de un cambio en este orden, que se explica mediante eventos de permutación circular.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar evolución dirigida para mejorar (adaptar) el ensamblaje
- Determinar el número de mutaciones requeridas para mejorar la estabilidad/solubilidad de la o las quimeras y, si presentan, mejorar su actividad.
- Explorar los puntos de intersección que quedaron pendientes, así como la construcción del asa $\alpha_2\beta_3$ con la región N-terminal de MonoTIM y C-terminal de PRAI.

10. REFERENCIAS

- Akanuma, S., & Yamagishi, A. (2005). Identification and characterization of key substructures involved in the early folding events of a (β/α) 8-barrel protein as studied by experimental and computational methods. *Journal of molecular biology*, 353(5), 1161-1170.
- Akanuma, S., & Yamagishi, A. (2008). Experimental evidence for the existence of a stable half-barrel subdomain in the (β/α) 8-barrel fold. *Journal of molecular biology*, 382(2), 458-466.
- Albery WJ, Knowles JR. (1977). Efficiency and evolution of enzyme catalysis. *Angewandte Chemie*.16(5), 285-93.
- Bertolaet, B. L., & Knowles, J. R. (1995). Complementation of fragments of triosephosphate isomerase defined by exon boundaries. *Biochemistry*, 34(17), 5736-5743.
- Bogarad, L. D., & Deem, M. W. (1999). A hierarchical approach to protein molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 2591-2595.
- Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R., & Wierenga, R. K. (1993a). Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(4), 1515-1518.
- Borchert, T. V., Abagyan, R., Kishan, K. R., Zeelen, J., & Wierenga, R. K. (1993 b). The crystal structure of an engineered monomeric triosephosphate isomerase, monoTIM: the correct modelling of an eight-residue loop. *Structure*, 1(3), 205-213.
- Broom, A., Doxey, A. C., Lobsanov, Y. D., Berthin, L. G., Rose, D. R., Howell, P. L., & Meiering, E. M. (2012). Modular evolution and the origins of symmetry: reconstruction of a three-fold symmetric globular protein. *Structure*, 20(1), 161-171.
- Copley, R. R., and Bork, P. (2000) Homology among ($\beta\alpha$)-barrels: Implications for the evolution of metabolic pathways. *J. Mol. Biol.* 303, 627–641.
- Crisanti, M. M., & Matthews, C. R. (1981). Characterization of the slow steps in the folding of the. alpha. subunit of tryptophan synthase. *Biochemistry*, 20(9), 2700-2706.
- Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Hopp, T. P., & Edelman, G. M. (1979). Favin versus concanavalin A: Circularly permuted amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(7), 3218-3222.
- Eads, J. C., Ozturk, D., Wexler, T. B., Grubmeyer, C., & Sacchettini, J. C. (1997). A new function for a common fold: the crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Structure*, 5(1), 47-58.
- Eberhard, M., Tsai-Pflugfelder, M., Bolewska, K., Hommel, U., & Kirschner, K. (1995). Indoleglycerol phosphate synthase: phosphoribosyl anthranilate isomerase: Comparison of the bifunctional enzyme from *Escherichia coli* with engineered monofunctional domains. *Biochemistry*, 34(16), 5419-5428.
- Eder, J., & Kirschner, K. (1992). Stable substructures of eightfold. beta.. alpha.-barrel proteins: fragment complementation of phosphoribosylanthranilate isomerase. *Biochemistry*, 31(14), 3617-3625.

- Einspahr, H., Parks, E. H., Suguna, K. A. Z. A., Subramanian, E. S. W. A. R. A., & Suddath, F. L. (1986). The crystal structure of pea lectin at 3.0-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 261(35), 16518-16527.
- Fani, R., Mori, E., Tamburini, E., & Lazcano, A. (1998). Evolution of the structure and chromosomal distribution of histidine biosynthetic genes. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 28(4-6), 555-570.
- Gerlt, J. A., & Raushel, F. M. (2003). Evolution of function in (β/α) 8-barrel enzymes. *Current opinion in chemical biology*, 7(2), 252-264.
- Gilbert, W., & Glynias, M. (1993). On the ancient nature of introns. *Gene*, 135(1-2), 137-144.
- Goldenberg, D. P., & Creighton, T. E. (1983). Circular and circularly permuted forms of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Journal of molecular biology*, 165(2), 407-413.
- Goldman, A. D., Beatty, J. T., & Landweber, L. F. (2016). The TIM barrel architecture facilitated the early evolution of protein-mediated metabolism. *Journal of molecular evolution*, 82(1), 17-26.
- Graf, R., & Schachman, H. K. (1996). Random circular permutation of genes and expressed polypeptide chains: application of the method to the catalytic chains of aspartate transcarbamoylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11591-11596.
- Henn-Sax, M., Thoma, R., Schmidt, S., Hennig, M., Kirschner, K., & Sterner, R. (2002). Two ($\beta\alpha$) 8-barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates. *Biochemistry*, 41(40), 12032-12042.
- Hommel U, Eberhard M, Kirschner K. (1995). Phosphoribosyl anthranilate isomerase catalyzes a reversible amidori reaction. *Biochemistry*. 34(16),5429-39.
- Höcker, B., Beismann-Driemeyer, S., Hettwer, S., Lustig, A., & Sterner, R. (2001). Dissection of a ($\beta\alpha$) 8-barrel enzyme into two folded halves. *Nature structural biology*, 8(1), 32-36.
- Höcker, B., Schmidt, S., & Sterner, R. (2002). A common evolutionary origin of two elementary enzyme folds. *FEBS letters*, 510(3), 133-135.
- Höcker, B., Claren, J., & Sterner, R. (2004). Mimicking enzyme evolution by generating new ($\beta\alpha$) 8-barrels from ($\beta\alpha$) 4-half-barrels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(47), 16448-16453.
- Huang, P. S., Feldmeier, K., Parmeggiani, F., Velasco, D. A. F., Höcker, B., & Baker, D. (2016). De novo design of a four-fold symmetric TIM-barrel protein with atomic-level accuracy. *Nature chemical biology*, 12(1), 29.
- Ionescu, R. M., Smith, V. F., O'Neil, J. C., & Matthews, C. R. (2000). Multistate equilibrium unfolding of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: thermodynamic and spectroscopic description of the native, intermediate, and unfolded ensembles. *Biochemistry*, 39(31), 9540-9550.
- Jasanoff, A., Davis, B., & Fersht, A. R. (1994). Detection of an Intermediate in the Folding of the (β/α) 8-Barrel N-(5'-Phosphoribosyl) anthranilate Isomerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 33(20), 6350-6355.

- Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M., & Sterner, R. (2000). Directed evolution of a ($\beta\alpha$) 8-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 9925-9930.
- Kadamuri, R. V., Irukuvajjula, S. S., & Vadrevu, R. (2019). $\beta\alpha\beta$ Super-Secondary Motifs: Sequence, Structural Overview, and Pursuit of Potential Autonomously Folding $\beta\alpha\beta$ Sequences from (β/α) 8/TIM Barrels. In *Protein Supersecondary Structures* (pp. 221-236). Humana Press, New York, NY.
- Kirschner K, Szadkowski H, Jardetzky TS, Hager V. (1987). Phosphoribosylanthranilate isomerase/indoleglycerol-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Methods in enzymology*. 142,386-97.
- Kita, A., Kasai, S., Miyata, M., & Miki, K. (1996). Structure of Flavoprotein FP390 From a Luminescent Bacterium *Photobacterium Phosphoreum* Refined at 2.7 Å Resolution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 52(Pt 1), 77-86.
- Knowles, J. R. (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature*, 350(6314), 121.
- Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., Sterner, R., & Wilmanns, M. (2000). Structural evidence for evolution of the β/α barrel scaffold by gene duplication and fusion. *Science*, 289(5484), 1546-1550.
- Lapidoth, G., Khersonsky, O., Lipsh, R., Dym, O., Albeck, S., Rogotner, S., & Fleishman, S. J. (2018). Highly active enzymes by automated combinatorial backbone assembly and sequence design. *Nature communications*, 9(1), 1-9.
- Lebioda, L., Stec, B., & Brewer, J. M. (1989). The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution. An 8-fold beta+ alpha-barrel with a novel beta beta alpha alpha (beta alpha) 6 topology. *Journal of Biological Chemistry*, 264(7), 3685-3693.
- Leopoldseder, S., Claren, J., Jürgens, C., & Sterner, R. (2004). Interconverting the catalytic activities of ($\beta\alpha$) 8-barrel enzymes from different metabolic pathways: sequence requirements and molecular analysis. *Journal of molecular biology*, 337(4), 871-879.
- Lodi PJ, Knowles JR. (1991). Neutral imidazole is the electrophile in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase: structural origins and catalytic implications. *Biochemistry*.16;30(28), 6948-56.
- Luger, K., Hommel, U., Herold, M., Hofsteenge, J., & Kirschner, K. (1989). Correct folding of circularly permuted variants of a beta alpha barrel enzyme in vivo. *Science*, 243(4888), 206-210.
- Lynch, M., & Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *science*, 290(5494), 1151-1155.
- Miles, E. W., Yutani, K., & Ogasahara, K. (1982). Guanidine hydrochloride-induced unfolding of the. alpha. subunit of tryptophan synthase and of the two. alpha. proteolytic fragments: evidence for stepwise unfolding of the two. alpha. domains. *Biochemistry*, 21(11), 2586-2592.
- Moore, S. A., James, M. N., O'Kane, D. J., & Lee, J. (1993). Crystal structure of a flavoprotein related to the subunits of bacterial luciferase. *The EMBO journal*, 12(5), 1767-1774.

- Nagano, N., Orengo, C. A., and Thornton, J. M. (2002) One fold with many functions: The evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J. Mol. Biol.* 321, 741–765.
- Nikkhah, M., Jawad-Alami, Z., Demydchuk, M., Ribbons, D., & Paoli, M. (2006). Engineering of β -propeller protein scaffolds by multiple gene duplication and fusion of an idealized WD repeat. *Biomolecular engineering*, 23(4), 185-194.
- Ochoa-Leyva, A., Soberón, X., Sánchez, F., Argüello, M., Montero-Morán, G., & Saab-Rincón, G. (2009). Protein design through systematic catalytic loop exchange in the (β/α) 8 fold. *Journal of molecular biology*, 387(4), 949-964.
- Pace, C. N. (1986). [14] Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. In *Methods in enzymology* (Vol. 131, pp. 266-280). Academic Press.
- Priestle, J. P., Grütter, M. G., White, J. L., Vincent, M. G., Kania, M., Wilson, E., ... & Jansonius, J. N. (1987). Three-dimensional structure of the bifunctional enzyme N-(5'-phosphoribosyl) anthranilate isomerase-indole-3-glycerol-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16), 5690-5694.
- Pujadas, G., and Palau, J. (1999) TIM barrel fold: Structural, functional and evolutionary characteristics in natural and designed molecules. *Biologica (Bratislava, Slovakia)* 54, 231–253.
- Richter, M., Bosnali, M., Carstensen, L., Seitz, T., Durchschlag, H., Blanquart, S., ... & Sterner, R. (2010). Computational and experimental evidence for the evolution of a (β/α) 8-barrel protein from an ancestral quarter-barrel stabilised by disulfide bonds. *Journal of molecular biology*, 398(5), 763-773.
- Rieder SV, Rose IA. (1959). The mechanism of the triosephosphate isomerase reaction. *The Journal of biological chemistry*. 234(5),1007-10.
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K., & Jones, T. A. (1990). Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, 249(4967), 380-386.
- Saab-Rincón, G., Juárez, V. R., Osuna, J., Sánchez, F., & Soberón, X. (2001). Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein engineering*, 14(3), 149-155.
- Saab-Rincón, G., Olvera, L., Olvera, M., Rudiño-Piñera, E., Benites, E., Soberón, X., & Morett, E. (2012). Evolutionary walk between (β/α) 8 barrels: catalytic migration from triosephosphate isomerase to thiamin phosphate synthase. *Journal of molecular biology*, 416(2), 255-270.
- Sánchez del Pino, M. M., & Fersht, A. R. (1997). Nonsequential unfolding of the α/β barrel protein indole-3-glycerol-phosphate synthase. *Biochemistry*, 36(18), 5560-5565.
- Schliebs W, Thanki N, Jaenicke R, Wierenga RK. (1997). A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*. 36(32):9655-62.
- Schnackerz, K. D., & Gracy, R. W. (1991). Probing the catalytic sites of triosephosphate isomerase by ^{31}P -NMR with reversibly and irreversibly binding substrate analogues. *European journal of biochemistry*, 199(1), 231-238.

- Seitz, T., Bocola, M., Claren, J., & Sterner, R. (2007). Stabilisation of a ($\beta\alpha$) 8-barrel protein designed from identical half barrels. *Journal of molecular biology*, 372(1), 114-129.
- Shanmugaratnam, S., Eisenbeis, S., & Höcker, B. (2012). A highly stable protein chimera built from fragments of different folds. *Protein Engineering, Design & Selection*, 25(11), 699-703.
- Sharma, P., Kaila, P., & Guptasarma, P. (2016). Creation of active TIM barrel enzymes through genetic fusion of half-barrel domain constructs derived from two distantly related glycosyl hydrolases. *The FEBS journal*, 283(23), 4340-4356.
- Shukla, A., & Guptasarma, P. (2004). Folding of β/α -unit scrambled forms of *S. cerevisiae* triosephosphate isomerase: Evidence for autonomy of substructure formation and plasticity of hydrophobic and hydrogen bonding interactions in core of (β/α) 8-barrel. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(3), 548-557.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), 539.
- Smith, M. A., Romero, P. A., Wu, T., Brustad, E. M., & Arnold, F. H. (2013). Chimeragenesis of distantly-related proteins by noncontiguous recombination. *Protein science*, 22(2), 231-238.
- Soberón, X., P. Fuentes-Gallego and G. Saab-Rincon. (2004). In vivo fragment complementation of a (beta/alpha)(8) barrel protein: generation of variability by recombination. *FEBS Lett.*, 560(1-3), 167-72.
- Söding, J., & Lupas, A. N. (2003). More than the sum of their parts: on the evolution of proteins from peptides. *Bioessays*, 25(9), 837-846.
- Spezio, M., Wilson, D. B., & Karplus, P. A. (1993). Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. *Biochemistry*, 32(38), 9906-9916.
- Tomii, K., Sawada, Y., & Honda, S. (2012). Convergent evolution in structural elements of proteins investigated using cross profile analysis. *BMC bioinformatics*, 13(1), 1-18.
- Wang, J., Zhang, T., Liu, R., Song, M., Wang, J., Hong, J., ... & Liu, H. (2017). Recurring sequence-structure motifs in ($\beta\alpha$) 8-barrel proteins and experimental optimization of a chimeric protein designed based on such motifs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1865(2), 165-175.
- Watanabe, H., Yamasaki, K., & Honda, S. (2014). Tracing primordial protein evolution through structurally guided stepwise segment elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(6), 3394-3404.
- Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., & Hol, W. G. J. (1991). Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate: A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *Journal of molecular biology*, 220(4), 995-1015.

- Wise, E. L., & Rayment, I. (2004). Understanding the importance of protein structure to nature's routes for divergent evolution in TIM barrel enzymes. *Accounts of chemical research*, 37(3), 149-158.
- Yadid, I., & Tawfik, D. S. (2007). Reconstruction of functional β -propeller lectins via homo-oligomeric assembly of shorter fragments. *Journal of molecular biology*, 365(1), 10-17.
- Zárate-Pérez, F., Chánez-Cárdenas, M. E., Arreola, R., Torres-Larios, A., & Vázquez-Contreras, E. (2009). Different catalytic properties of two highly homologous triosephosphate isomerase monomers. *Biochemical and biophysical research communications*, 382(3), 626-630.
- Zheng, F., Vermaas, J. V., Zheng, J., Wang, Y., Tu, T., Wang, X., ... & Luo, H. (2019). Activity and thermostability of GH5 endoglucanase chimeras from mesophilic and thermophilic parents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85(5), e02079-18.
- Zitzewitz, J. A., Gualfetti, P. J., Perkons, I. A., Wasta, S. A., & Matthews, C. R. (1999). Identifying the structural boundaries of independent folding domains in the α subunit of tryptophan synthase, a β/α barrel protein. *Protein science*, 8(6), 1200-1209.
- Zomosa-Signoret, V., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., ... & Gómez-Puyou, A. (2003). Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry*, 42(11), 3311-3318.

11. ANEXOS

Protocolos

Purificación de productos de PCR mediante “High pure PCR purification Kit” (ROCHE)

1. Por cada 100 µl de producto de PCR se agregan 500 µl de solución 1 (Binding buffer) o bien por cada 100 mg de agarosa se agregan 300 µl de solución 1.
2. Se agita la mezcla en vórtex y se incuba 5 minutos a 50°C y se agita en vórtex para fundir la agarosa.
3. La totalidad de la solución se pasa por un filtro (volumen máximo 700 µl de solución) centrifugado a 15000 rpm durante 30 segundos.
4. El volumen eluido se desecha y el filtro se lava con 500 µl de solución 2 (wash buffer). El filtro se centrifuga 30 segundos a 15000 rpm y se repite el lavado con 200 µl de solución 2.
5. El filtro se seca en Savant durante 5 minutos a 60°C.
6. Se calienta y agrega 150 µl de agua milliQ al filtro para eluir el DNA.
7. El filtro se centrifuga a 15000 RPM sobre un tubo eppendorf limpio y estéril.

Purificación de plásmido mediante “High pure plasmid purification Kit” (ROCHE)

1. A partir de un cultivo de LB que contenga el plásmido de interés se centrifugan 4 ml
2. Se decanta el medio de cultivo y la pastilla se resuspende mediante vórtex en 250 µl de solución 1 (Suspension buffer). La mezcla se deja incubando a temperatura ambiente 5 minutos.
3. Se agregan 250 µl de solución 2 (Lysis buffer) y se agita cuidadosamente la mezcla mediante inversiones lentas unas 4 o cinco veces. La solución se deja incubando 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se agregan 350 µl de solución 3 (Binding buffer) previamente enfriada y se agita cuidadosamente la mezcla mediante inversiones lentas unas 4 o cinco veces. La solución se deja incubando 5 minutos en hielo.
5. La muestra se centrifuga a 15000 rpm durante 10 minutos

6. El sobrenadante se pasa a un filtro y éste se centrifuga 30 segundos a 15000 rpm
7. El filtro se lava con 500 μ l de solución 4 (Wash buffer I), centrifugando a 15000 rpm
8. durante 30 segundos.
9. Posteriormente se agregan 500 μ l de solución 5 (Wash buffer II) y se centrifuga a 15000 por 30 segundos. Se repite el lavado agregando 200 μ l de solución 5.
10. El filtro se seca en Savant durante 5 minutos a 40°C.
11. Se agrega de 70 a 100 μ l de solución 6 (Elution buffer) sola o en una mezcla 1:1 con agua milliQ al filtro para eluir el plásmido, puede calentarse un poco la solución para incrementar el rendimiento de plásmido eluido.
12. El filtro se deja reposar 5 minutos y se centrifuga a 15000 por 1 minuto sobre un tubo eppendorf limpio y estéril.
13. El plásmido puro se guarda a -20°C

Preparación de las muestras de DNA ligado para su transformación

1. Se agrega n-butanol a la ligación de DNA en una relación 1:1.
2. Se agita fuertemente la mezcla hasta homogenizar el n-butanol y el medio acuoso de la ligación de DNA.
3. Una vez homogenizada la solución se centrifuga durante 10 minutos a 14000 rpm.
4. Se decanta el n-butanol con pipeta cuidando de no remover la pastilla.
5. Se seca la pastilla en Savant por 5 o 10 minutos a 60°C.
6. Se resuspende la pastilla con 5 μ l de agua milliQ y se transforman 2 μ l de ligación en alícuotas de 50 μ l de células electro competentes.

Preparación de células calcio competentes

1. Previo a la preparación de las células se estría en una caja con LB/antibiótico una colonia de la cepa a preparar, para asegurar partir de un único fenotipo se hace un re-estriado de 3 veces consecutivas como mínimo de la colonia más aislada en la caja.

2. Se toma una colonia aislada de la caja con la última estriada y se inocula en aproximadamente 5 o 10 ml de medio LB/antibiótico para tener un pre-inoculo. Se deja incubando el cultivo 12 horas a 37°C.
3. Se inoculan 5 ml del pre-inoculo en 30 ml de medio LB y el medio se incuba a 37°C hasta que el crecimiento alcance una DO600= 0.6
4. El cultivo se centrifuga por 10 minutos a 2500 rpm a 4°C. El sobrenadante se decanta cuidadosamente y la pastilla se resuspende mediante agitación lenta en baño de hielo con 2 ó 3 ml de CaCl₂ 0.1 M frío (4°C).
5. La pastilla resuspendida se afora a 15 ml con CaCl₂ 0.1 M frío (4°C) y la solución se incuba 30 min en hielo.
6. Se centrifuga el cultivo 10 minutos a 2500 rpm a 4°C. Se decanta el sobrenadante y la pastilla se resuspende mediante agitación lenta en baño de hielo en 1.5 ml de CaCl₂ 0.1M frío (4°C).
7. Una vez resuspendido el cultivo se adiciona 123 µl de DMSO y se agita lentamente para mezclar. El cultivo se reparte en alícuotas de 200 µl en eppendorfs de 1.5 ml estériles y se almacenan a -80°C.

Transformación de células calcio competentes

1. Se agregan 10 µl de vector purificado ligado con el inserto a una alícuota de 100 µl de células calcio competentes previamente descongeladas en hielo y agita un poco para mezclarlas (NO vortex).
2. Se incuban las células en hielo por 45 minutos agitando lentamente cada 15 minutos.
3. Pasados los 45 minutos el tubo con las células se incuba inmediatamente a 42°C por 90 segundos.
4. Se añade 900 µl de medio líquido LB y el cultivo se incuba 1 hora a 37° en agitación constante.
5. Se plaquean volúmenes conocidos de cultivo en cajas petri con LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente.
6. Las cajas se incuban a 37°C durante 12 horas o hasta observar crecimiento.

Preparación de células electrocompetentes

1. Previo a la preparación de las células se estría en una caja con LB/antibiótico una colonia de la cepa a preparar, para asegurar partir de un único fenotipo se hace un re-estriado de 3 veces consecutivas como mínimo de la colonia más aislada en la caja.
2. Se toma una colonia aislada de la caja con la última estriada y se inocula en aproximadamente 10 ml de medio LB/antibiótico para tener un pre-inoculo. Se deja incubando el cultivo 12 horas a 37°C.
3. Se inocula el pre-inoculo en un litro de medio LB y el cultivo se incuba en agitación constante a 37°C hasta que la DO600 sea de 0.6-0.9 nm. NOTA: Entre mayor DO mejor.
4. Una vez alcanzada la DO600, el cultivo se enfría 30 minutos en hielo y se centrifuga a 5 mil rpm 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se decanta y la pastilla se resuspende en un baño con hielo muy lentamente en la mitad del volumen original con glicerol al 10% frío.
5. El cultivo se centrifuga a 5 mil rpm 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se decanta, la pastilla se resuspende en ¼ del volumen original con glicerol al 10% en baño con hielo.
6. El cultivo se centrifuga a 5 mil rpm 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se decanta, la pastilla se resuspende en 2 ml de glicerol al 10% y 2 ml de GYT en baño con hielo.
7. El cultivo se divide en alícuotas de 50 μ l en tubos eppendors estériles y se guardan a -70 °C.

Transformación de células electrocompetentes

1. Se mezclan 2 μ l de plásmido súper enrollado (1 μ g de DNA) o 5 μ l de ligación en 50 μ l de células electrocompetentes cuidando de no formar burbujas.
2. La mezcla se traslada a una celda de electroporación de 0.1 cm (Bio-Rad) cuidando de no formar burbujas. Se secan las paredes de la celda y ésta se coloca en un electroporador Gene Pulser (Bio-RAD) dando un pulso de 1.8 voltios.

3. Inmediatamente después del pulso se adiciona al cultivo transformado 980 μ l de medio SOB adicionado con 10 μ l de Glucosa 2 M y 10 μ l de $MgCl_2$ 1 M (medio SOC).
4. El cultivo se incuba 1 hora a 37°C en agitación constante y posteriormente se plaquean diferentes volúmenes de cultivo transformado en medio LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente.
5. Las cajas se incuban a 37°C durante 12 horas o hasta observar crecimiento.