

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**MIGRACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE
CARBOXILESTERASA HACIA 7-KAP SINTASA.**

T E S I S

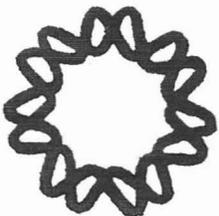
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

BIOL. NGUYEN ESMERALDA LOPEZ LOZANO

TUTOR: DR. RICARDO A. GRANDE CANO



CUERNAVACA, MORELOS

2005

m. 347204



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Nguyen Esmeralda López Lozano

FECHA: 23/Agosto/2005

FIRMA: 

Esta tesis fue realizada en el laboratorio del Dr. Enrique Morett Sánchez, en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Ricardo A. Grande Cano.

A Lao-tse, Xochitl y Tonatzin

Agradecimientos Académicos

Agradezco al Dr. Enrique Morett por las ideas y facilidades prestadas para la realización del proyecto así como por el apoyo académico brindado y revisión de tesis. Al Dr. Ricardo Grande y al Dr. Humberto Flores por la asesoría en el proyecto y revisión de tesis.

Al Dr. Lorenzo Segovia y al Dr. Eduardo Horjales por la asesoría e ideas aportadas como miembros de mi comité tutorial.

A el Dr. Mario Soberon, Dr. David Romero y Dr. Guillermo Gosset por sus comentarios y revisión de tesis.

A los técnicos Maricela Olvera Rodríguez y Jorge A. Yanez Ponce de Leon de la unidad de secuencia, por la secuenciación de DNA, así como a Leticia Olvera Rodríguez por sus aportaciones a la metodología.

Al Dr. Paul Gaytan y al M.C. Eugenio López de la unidad de síntesis, por la síntesis de los oligonucleótidos empleados en el presente proyecto.

Agradecimientos Personales

Agradezco nuevamente al Dr. Enrique Morett y a su grupo por sentar las bases dentro de mi formación en la investigación científica.

A Ricardo por compartir tus conocimientos y paciencia conmigo.

A Humberto por todas las cosas que he aprendido de ti tanto en lo académico como en lo personal, por compartir tu tiempo y ociosidad, por querer enseñarme lo positivo en lo negativo, por ser mi amigo.

A Gabriel y Christian por la amistad que espero trascienda al IBT.

A todo el resto del grupo Alfredo, Lety, Mary y Angel por sus ideas, consejos, sugerencias y compañía, a Nelly, Juanita y Pancho por lo fundamental de su trabajo.

A el grupo del Dr. Xavier Soberon.

A Lorenzo por la insistencia, apoyo y empujones para que terminara esta tesis.

A Javier por lo mucho que aprendí y podemos aprender, todavía.

A los de siempre por amor, Emiliano y Lupita. A los de siempre por sangre, Lao, Xochitl y Nancy. A los de siempre por convicción Uri y Vero.

A los que debo agradecer y se me olvidan.

Índice General

Resumen	1
Introducción	2
Reseña de la evolución de proteínas.....	2
Manipulación de proteínas.....	3
Aplicaciones de la evolución dirigida.....	6
Biosíntesis de biotina.....	11
La carboxilesterasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
Propósitos del proyecto.....	16
Objetivos e Hipótesis	18
Metodología	19
Generación de las librerías de mutantes.....	19
Transformación y selección.....	20
Optimización del medio de cultivo.....	21
Caracterización por secuencia.....	22
Construcción de bancos mutagénicos y recombinación <i>in vitro</i>	22
Otras construcciones generadas.....	23
Purificación de 7-KAPs.....	23
Resultados	25
Librerías mutagénicas.....	25
Selección de variantes.....	26
Fenotipo de las variantes.....	28
Características de las variantes.....	29
Aproximación estructural.....	36
Modelo de CAE16.....	36
Modelo de CAE12.....	37
Modelo de CAE7.....	37
Bancos remutagenizados y recombinación <i>in vitro</i>	39
Otras construcciones generadas.....	40
Purificación de la enzima 7-KAPs.....	42
Discusión	43
Características de las librerías mutagénicas.....	43
Sistema de selección.....	44
Características de las mutantes y su optimización.....	48
Aspecto estructural.....	49
Perspectivas.....	51
Conclusiones	53
Referencias	54
Apéndice	60

Índice de tablas y figuras

Figuras

Figura 1	Algoritmo básico de las dos grandes metodologías para modificar enzima.....	4
Figura 2	Vía para sintetizar biotina en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas	12
Figura 3	Reacción catalizada por la enzima 7-KAPs.....	13
Figura 4	Estructura tridimensional de la 7-KAPs de <i>E. Coli</i>	13
Figura 5	Modelo estructural de la carboxilesterasa de <i>P. aeruginosa</i>	15
Figura 6	Vector de expresión pKK223-3.....	19
Figura 7	Vector de expresión pUC18.....	20
Figura 8	Esquema de las librerías	21
Figura 9	Esquema general del método experimental	24
Figura 10	Proceso de selección de CAE16.....	26
Figura 11	Proceso de selección de CAE7 y CAE12.....	27
Figura 12	Fenotipo observado en caja	28
Figura 13	Alineamiento de nucleótidos comparando las mutantes con el gene silvestre	31
Figura 14	Alineamiento de aminoácidos.....	33
Figura 15	Modelo estructural de la CAE16.....	37
Figura 16	Modelo de la mutante CAE12.....	38
Figura 17	Modelo de la mutante CAE7.....	38
Figura 18	Representación de todas la mutaciones encontradas en las tres candidatas.....	39
Figura 19	Esquema de cómo se realizó la construcción de la mutante CAE16+ α h.....	41
Figura 20	Esquema de cómo se realizó la construcción de la mutante CAE01- α h.....	41
Figura 21	Enzima 7-KAPs purificada.....	42
Figura 22	Esquema de la retroalimentación en la ruta de síntesis de biotina.....	47
Figura 23	Reacción acoplada que se empleara para medir la actividad <i>in vitro</i>	52

Tablas

Tabla 1	Diferentes técnicas de recombinación.....	60 (Apéndice)
Tabla 2	Comparación de los cambios generados en CAE16 con el gene silvestre.....	34
Tabla 3	Comparación de las mutaciones de CAE12 con respecto al gene silvestre.....	35
Tabla 4	Comparación de los cambios encontrados en CAE7.....	35

Resumen

Nuestro grupo de investigación está interesado en conocer el mecanismo por el cual se originan actividades enzimáticas diferentes. Para ello creemos que es posible simular el proceso evolutivo en condiciones de laboratorio empleando como modelo de trabajo enzimas involucradas en las vías biosintéticas de vitaminas. La presencia en la naturaleza de enzimas no homólogas que llevan a cabo reacciones idénticas, sugiere una gran plasticidad evolutiva para el origen de enzimas con actividades nuevas. Sin embargo, el demostrar cómo se da este fenómeno ha sido una tarea difícil, sobre todo cuando no se cuenta con los métodos de selección adecuados. En este trabajo, el propósito central fue la generación de variantes de la enzima carboxilesterasa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, que fueran capaces de complementar la auxotrofia hacia biotina de una mutante de *Escherichia coli* que carece del gene *bioF*, el cual codifica para la enzima 7-ceto-8-amino-pelargónico sintasa (7-KAPs) que participa en el segundo paso de la síntesis de esta vitamina. El gene que codifica para la carboxilesterasa fue sujeto a rondas de PCR mutagénico para la generación de librerías. Estas construcciones se transformaron en la cepa mencionada y se seleccionaron mutantes de carboxilesterasa que complementaran la incapacidad de crecimiento en medio mínimo carente de biotina. Se han identificado tres variantes cuyo fenotipo se conserva al ser retransformados los genes en la cepa de selección. Asimismo se construyeron bancos de recombinación *in vitro* y remutagenizados en búsqueda de mejores fenotipos sin que hasta el momento se hayan identificado nuevas variantes con mejor capacidad de complementación. En conclusión, hemos obtenido evidencia fenotípica de una migración de actividad enzimática a partir de proteínas que no están relacionadas en secuencia y que presentan un plegamiento diferente.

Introducción

Reseña de la evolución de proteínas

El aspecto evolutivo de los procesos biológicos, desde el planteamiento de la teoría de Darwin, ha sido un interés básico para los dedicados a estudiar la vida. En este sentido, el revolucionario descubrimiento y elucidación del papel del DNA, aceleró el entendimiento de los patrones y procesos a nivel molecular, comenzando desde los trabajos pioneros de Zuckerkandl y Pauling (Zuckerkandl and Pauling, 1965), que permitieron por medio del alineamiento de secuencias de proteínas homólogas hablar de un reloj molecular o construir árboles filogenéticos. Posteriormente en la década de los 80s se reforzó con la consolidación de la teoría neutral, que permitió conocer y explicar fenómenos como la divergencia y el polimorfismo (Kimura, 1979, 1991). Gracias a esto, ahora sabemos que si pudiéramos observar la evolución a escala molecular durante los millones de años que implica, veríamos que las proteínas evolucionan por duplicación génica como mecanismo predominante, seguida de modificaciones en secuencia que conllevan sustituciones, así como pequeñas inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos (Maynard, 1970). Cada uno de estos cambios va siendo sometido a la selección natural, entonces para que una mutación sea fijada, generalmente el resultado de esta modificación debe ofrecer al organismo una ventaja selectiva sobre la proteína nativa o debe ser neutral.

La duplicación génica se puede dar a varios niveles, desde duplicaciones parciales de un gene hasta duplicaciones de genomas completos. Las proteínas originadas por eventos de duplicación son llamadas "parálogas", mientras que las originadas a partir de eventos de especiación son llamadas "ortólogas" (Fitch, 1970). Asimismo los fenómenos de transferencia horizontal también pueden dar lugar a la generación de nuevas funciones (Nelson *et al.*, 1999).

Las proteínas que poseen un origen filogenético común van a mostrar similitud en su secuencia, estructura y en ocasiones también en función. Pero independientemente de

éstas, desde eras muy tempranas de la enzimología se ha documentado la existencia de enzimas sin parentesco aparente, pero que presentan la misma actividad, a las cuales se les denomina enzimas “análogas” (Warburg, 1943). Resultan ser más comunes de lo que podría pensarse, pues al analizar las secuencias de enzimas depositadas en los bancos de datos públicos, se ha reportado que más de 30 reacciones diferentes son catalizadas por dos o más proteínas, en las cuales no puede detectarse similitud en su secuencia ni en su estructura. (Galperin *et al.*, 1998). En otras palabras, varias actividades enzimáticas se han inventado independientemente en la evolución en más de una ocasión. Esto no quiere decir que estas enzimas no tienen nada en común, simplemente no poseen la misma ancestría, aunque pueden tener un mecanismo de reacción y una geometría del sitio activo similar.

Manipulación de proteínas

El avance en la comprensión de los procesos evolutivos junto con el surgimiento de poderosas metodologías, nos ha llevado hasta la época genómica actual y a comenzar a dar el siguiente paso que es emplear la proteómica para estudiar las redes metabólicas, las de regulación y como interaccionan, así como la comparación integral entre las diferentes especies. En este contexto, se ha desarrollado a la par el interés en aplicaciones experimentales y tecnológicas de la información. Una parte se ha enfocado en la manipulación de enzimas y su biocatálisis, con la intención de estudiar la adaptación de las proteínas en una gran variedad de contextos ya sean naturales o artificiales.

Durante la última década, la evolución dirigida surge como el método de elección para modificar la función y propiedades de las enzimas, lo que se refleja en el número de publicaciones que la involucran, demostrando así su capacidad. Por ejemplo, un análisis de los artículos en la literatura biomédica publicados entre 1995 y 2004 usando la base de datos bibliográfica “The National Institutes of Health MEDLINE”, muestra que este tipo de publicaciones se han incrementado de 4 por año en 1995 a 60 por año en el 2004 (Labrou, 2005).

Antes del surgimiento de esta metodología, se empleaba solamente el diseño racional, cuya desventaja radica en que es necesario conocer a detalle la relación estructura-función de la proteína de interés (figura 1a), pero la ventaja es que cuando el cambio propuesto tiene el resultado esperado, el diseñador entiende el principio bioquímico que le dió lugar (Penning and Jez, 2001).

En ausencia de información detallada sobre la estructura y mecanismo catalítico, la evolución dirigida parece ser la mejor opción a seguir porque permite encontrar soluciones por vías inesperadas, ya que simula a la evolución natural siguiendo sus principios básicos, como son generar diversidad molecular permitiendo la introducción y recombinación de mutaciones, seguido de la selección de variantes exitosas, es decir, que poseen las características deseadas (figura 1b) (Zhao *et al.*, 2002).

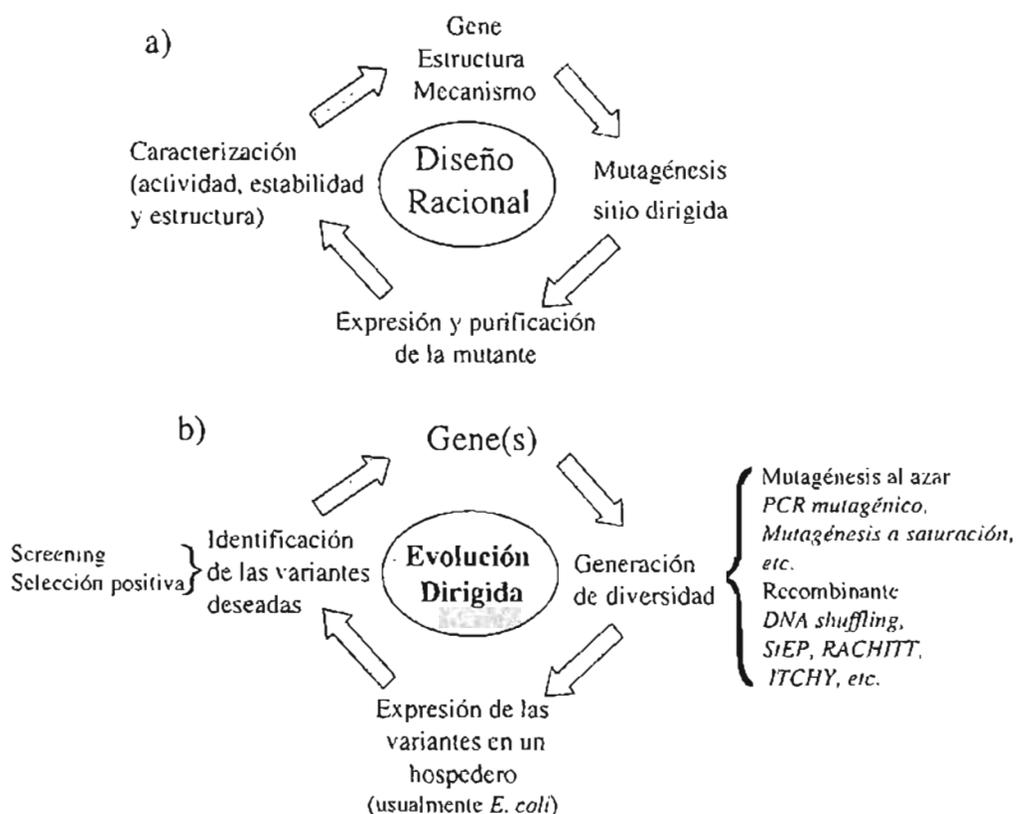


Fig. 1 Algoritmo básico de las dos grandes metodologías para modificar enzimas. En la parte a) se muestran los pasos generales a seguir en el diseño racional, en la parte b) los pasos de la evolución dirigida. Se muestran como ciclos ya que para llegar a los resultados óptimos generalmente se requiere aplicar varias rondas en ambos procesos (Williams *et al.*, 2004).

Para el primer paso en un experimento de evolución dirigida, que es generar diversidad, existen varias metodologías capaces de introducir mutaciones al azar. Actualmente las más recurrentes son la mutagénesis a saturación y la PCR (polymerase chain reaction) mutagénica. La primera de ellas consiste en la generación de oligonucleótidos degenerados para modificar las posiciones deseadas, introduciendo codones para todos los posibles aminoácidos (Skandalis *et al.*, 1997). Para la PCR mutagénica se emplea una técnica común de amplificación de genes alterando las condiciones de reacción. La enzima protagonista de la técnica es la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerasa), de gran utilidad por su estabilidad a altas temperaturas. Normalmente esta enzima tiene un porcentaje de error en la amplificación que varía entre 0.001 a 0.02 % dependiendo de las condiciones de reacción, esto es, incorpora aproximadamente un nucleótido erróneo cada mil bases (Eckert and Kunkel, 1990, 1991). Como para propósitos de evolución dirigida esta fidelidad resulta de poca utilidad, se alteran las condiciones de reacción aumentando la concentración de magnesio, agregando manganeso y colocando concentraciones desbalanceadas de los nucleótidos (la pirimidinas más concentradas que las purinas); así se puede incrementar el porcentaje de error hasta un 2% o más (Cadwell and Joyce, 1994; Zacco and Gherardi, 1999).

En la naturaleza los cambios más radicales en evolución se originan por recombinación. Stemmer fue el primero en simularlo por la técnica de “DNA shuffling” (Stemmer, 1994b). La técnica consiste en mezclar y reensamblar pequeños fragmentos de DNA homólogos emparentados para formar un nuevo gene. En este “barajeo”, la frecuencia de recombinación depende del grado de identidad y del tamaño de los fragmentos. Un requerimiento de esta técnica es que ocurra un alto nivel de recombinación para obtener todas las posibles combinaciones de los cambios deseados. Desde que la recombinación *in vitro* comenzó a ser viable, muchas modificaciones y nuevas metodologías comenzaron a surgir con la finalidad de resolver problemas particulares (tabla I Anexo).

Una vez generada la diversidad el siguiente paso es la selección, esta resulta de gran importancia ya que en ocasiones puede ser el paso limitante. Se divide en dos diversos grupos cuyos detalles dependen de los intereses del investigador, estos son el “screening” o

tamizado y la selección positiva (Cohen *et al.*, 2001), aunque en ocasiones se puede emplear la selección negativa de manera complementaria.

En el tamizado de una gran cantidad de variantes en un medio de cultivo, se deben escoger sólo las que presentan una característica específica, que se revela por la producción de algún color, fluorescencia, etcétera. En la selección genética positiva se hace crecer a las células en un medio con una presión selectiva específica, en el que solamente crecerán las que tengan una función viable. Dentro de los factores de selección se pueden mencionar algunos como la termoestabilidad, la resistencia a algunas drogas, la capacidad de crecer en presencia de agentes dañinos, la capacidad de complementar ciertas actividades enzimáticas, entre muchos otros.

La evolución dirigida es una herramienta prometedora. no solo para modificar enzimas para su empleo en la industria, sino también para estudiar la función y adaptación de las enzimas bajo condiciones controladas. Además, el hecho de que puedan definirse las presiones de selección, hace posible explorar funciones no naturales para distinguir las biológicamente relevantes de las físicoquímicamente posibles.

Aplicaciones de la evolución dirigida

Esta técnica ha sido aplicada en la modificación de la actividad, la especificidad de sustrato, la estabilidad térmica u oxidativa, la enantio-selectividad o enantio-especificidad, el rango de pH y la tolerancia a los solventes. En muchos casos se ha empleado en biocatálisis para reducir el número de pasos requeridos en una síntesis química o biocatalítica equivalente. A continuación mencionaré algunos ejemplos.

Lee y colaboradores generaron librerías por PCR mutagénica empleando la L-treonina aldolasa de *Pseudomonas aeruginosa* (LTA), la cual puede eliminar o generar acetaldehído mediante condensación aldólica o por ruptura aldólica respectivamente. Diseñaron y propusieron dos esquemas de selección para mutantes con propiedades incrementadas dependiendo del sentido de la reacción, utilizando en *E. coli* la toxicidad del

aldehído, el cual actúa como aceptor en la condensación aldólica. Por un lado utilizaron selección positiva, ya que si las mutantes presentaban actividad de LTA reducían el efecto tóxico del aldehído y eran capaces de sobrevivir. Por otro lado un esquema de selección negativa mostraba que la alta actividad de LTA produce más aldehído tóxico, el cual causa la muerte de las clonas correspondientes. De acuerdo al esquema de selección positiva lograron seleccionar mutantes de LTA con actividad mucho mayor a la silvestre (Lee, 2003).

Matsumura y Ellington usando bancos generados por PCR mutagénico y DNA shuffling, evolucionaron la β -glucuronidasa (*gusA*) de *E. coli* para catalizar la hidrólisis de β -galactósidos 500 veces más eficiente que la silvestre. Después de la selección y tamizado de las mutaciones funcionales, éstas fueron analizadas individualmente o en combinaciones introduciéndolas en un gene silvestre de *gusA*. El comportamiento enzimático de las proteínas mutantes con una serie de sustratos análogos, mostró que cuatro mutaciones son importantes para el cambio de especificidad de sustrato, además de ser sinérgicas, es decir, que son dependientes una de la otra (Matsumura and Ellington, 2001). Un intermediario evolutivo, en contradicción con la enzima silvestre y la forma evolucionada, puede exhibir una amplia especificidad de sustratos diferentes de los glucuronidósidos o galactósidos. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de "patchwork", la cual postula que las enzimas modernas divergen de ancestros de amplia especificidad (Jensen, 1976).

Existen enzimas que poseen similitud en su mecanismo catalítico y en su estructura pero que participan en diferentes vías metabólicas; esto sugiere que evolucionaron de un ancestro común. Jürgens y colaboradores desarrollaron un precursor de la enzima N⁻[(5'-fosforribosil)formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (ProFAR) isomerasa (HisA; EC 5.3.1.16) y de fosforribosilantranilato isomerasa (PRAI) (TrpF; EC 5.3.1.24), las cuales catalizan reacciones similares en la síntesis de los aminoácidos, histidina y triptofano respectivamente; además poseen una estructura similar de barril (β/α)₈. Usando mutagénesis al azar seguida de selección, generaron variantes de HisA que catalizan la reacción de TrpF, tanto *in vivo* como *in vitro*, una de estas variantes retiene significativamente la función de HisA. Al realizar un examen más detallado, el estudio

reveló que un solo cambio de aminoácido establece la actividad de TrpF en la proteína HisA. Esto sugiere que HisA y TrpF evolucionaron de una enzima ancestral de amplia especificidad por el sustrato. Este ejemplo destaca que los barriles (β/α)₈ son muy adecuados para el diseño de nuevas actividades catalíticas (Jurgens *et al.*, 2000).

La evolución dirigida puede anticipar la evolución y por lo tanto predecirla (Barlow and Hall, 2002). El desarrollo de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en microorganismos es producto de la rápida evolución de las β -lactamasas para catabolizar antibioticos. en el laboratorio se han podido generar β -lactamasas mutantes que después han sido aisladas clínicamente (Orencia *et al.*, 2001; Stemmer, 1994a; Zacco and Gherardi, 1999). En otro trabajo, Orencia y colaboradores combinando la evolución dirigida y el análisis estructural, pudieron dilucidar el mecanismo por el cual se desarrolla la resistencia a antibióticos β -lactámicos (Orencia *et al.*, 2001). Usando una cepa de *E. coli* generadora de mutaciones y selección en cefotaxima, generaron la misma triple mutante de β -lactamasa (Glu104Lys, Gly238Ser, Met182Thr) que había sido predicha por estudios previos usando altas tasas de mutagénesis (Zacco and Gherardi, 1999) y DNA shuffling (Stemmer, 1994a). La estructura cristalográfica de la β -lactamasa evolucionada reveló que las dos primeras mutaciones mejoraban el acceso al sitio activo, mientras que la tercera mutación (Met182Thr) compensaba los efectos deletéreos de las dos primeras. Al entender cómo surge la resistencia a antibióticos, esto podría ayudar a la predicción de las mutaciones clínicas y así ayudar al desarrollo de nuevos antibióticos.

El mayor impacto de estas metodologías en aplicaciones industriales se encuentra en el desarrollo de enzimas que sean capaces de mantener su actividad bajo condiciones en las que no podrían actuar comúnmente. Dentro de estos casos se encuentran parte de los trabajos de Arnold y colaboradores, que han estudiado ampliamente los mecanismos de adaptación a diferentes temperaturas (Farinas *et al.*, 2001). Logrando desde convertir a una enzima psicrófila (es decir, su actividad la despliega a bajas temperaturas) en su contraparte termófila (Miyazaki *et al.*, 2000), hasta lograr mantener el carácter mesófilico o psicrófilico mientras se aumenta la resistencia al incremento de temperatura (Arnold *et al.*, 2001). El hecho de que una enzima despliegue estas características a la vez, no es un

fenómeno que se presente normalmente en la naturaleza debido a las limitaciones fisicoquímicas intrínsecas de las proteínas y a que no existe esa presión de selección, lo cual refleja la poderosa herramienta que puede resultar la evolución *in vitro*.

Por otro lado un avance relevante es que también se pueden mejorar dos o más características a la vez. Por ejemplo, usando DNA shuffling, después de dos rondas de evolución dirigida fueron seleccionadas mutantes de la N-carbamil-D-aminoácido amidohidrolasa de *Agrobacterium tumefaciens* con una mayor estabilidad térmica y oxidativa. Estas se seleccionaron mediante un método de actividad calorimétrica en agar sólido con un indicador de pH (rojo fenol) y la presencia del sustrato (N-carbamil-D-*p*-hidroxifenilglicina)(Oh *et al.*, 2002). Un problema significativo cuando se desean desarrollar varias propiedades útiles en una misma enzima, es que puede resultar muy difícil seleccionar para dos o más características al mismo tiempo, por lo que una solución potencial a este problema es seleccionar de manera independiente una “progenie” con las características deseadas. Entonces se puede simular la recombinación meiótica por la técnica de “DNA family shuffling” para mezclar las mutaciones necesarias. En este proceso, múltiples genes relacionados pueden usarse como secuencias parentales, recombinarse por fragmentación aleatoria y reensamblarse para generar librerías quiméricas. En este sentido Ness y colaboradores construyeron mediante la técnica descrita, una librería quimérica de 26 genes de proteasas, la cual fue transformada en *Bacillus subtilis* y seleccionada para cuatro propiedades distintas: actividad a 23°C, termoestabilidad, estabilidad en el solvente y dependencia de pH. El “family shuffling” es eficiente para crear todas las combinaciones de las propiedades de las secuencias parentales, produciendo una gran diversidad de combinaciones en las enzimas progenie (Ness *et al.*, 1999).

A pesar de estas sorprendentes mejoras y de que los estudios de comparación de secuencias de familias de proteínas homólogas demuestran que la gran mayoría de las proteínas han evolucionado de ancestros que poseían actividades enzimáticas distintas (Farber and Petsko, 1990; Reardon and Farber, 1995), no se ha demostrado experimentalmente que por evolución dirigida sea posible hacer cambios radicales de

actividad (Jurgens *et al.*, 2000). Solo existen dos reportes sobre el desarrollo de una nueva actividad catalítica pero han sido por medio de diseño racional ya que se conoce como está posicionada la maquinaria catalítica y como ocurre la unión al sustrato.

En el primer caso se trabajó sobre la ciclofilina de *E. coli*, la cual cataliza la isomerización *cis-trans* de enlaces X-Pro, pero no se ha reportado que sea capaz de hidrolizar este tipo de enlaces. Mediante mutagénesis sitio dirigida de tres aminoácidos ubicados en la hendidura de unión al sustrato, se formó una triada catalítica similar a las encontradas en las serinproteasas, generando una enzima con la actividad de endoproteasa específica de prolina (Quemeneur *et al.*, 1998). En el segundo caso el diseño logró predecir de 18 a 22 mutaciones que introduciéndolas en una proteína de unión a ribosoma (RBP) adquiere la actividad de triosa fosfato isomerasa (TIM), estas mutantes de RBP son biológicamente activas, sustentando el crecimiento de *E. coli* en condiciones gluconeogénicas. RBP es un receptor periplásmico al que no se le conoce alguna actividad catalítica y TIM es un componente esencial de la vía Embden-Meyerhof ya que interconvierte dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehído-3-fosfato (Dwyer *et al.*, 2004).

En nuestro grupo de investigación se ha logrado la migración catalítica empleando dos enzimas que presentan el mismo plegamiento de barriles α/β , es decir, se logró migrar la actividad de triosa fosfato isomerasa monomérica (MonoTIM) hacia la de tiamina fosfato sintasa (*thiE*), esta última participa en la síntesis de tiamina. El proceso para la obtención de las mejores mutantes activas fue largo y requirió de un amplio trabajo. Se comenzó con la selección por complementación de la auxotrofia a tiamina de una sola mutante a partir de un banco generado por PCR mutagénico. A esto, siguieron tres generaciones de nuevas rondas de mutagénesis con las que se obtuvieron ya diversas variantes activas, las cuales se emplearon para realizar la recombinación *in vitro* por medio de la técnica denominada StEP (staggered extension process)(Joern *et al.*, 2002). Una vez identificadas las mutaciones conservadas en todas las variantes se procedió a la mutagénesis sitio dirigida sobre un gene silvestre de MonoTIM, para comprobar que gracias a estos cambios se logra la nueva actividad y el efecto que tiene cada una sobre la misma (datos no publicados). Con esta referencia parece ser que la selección empleando

las enzimas involucradas en las vías de síntesis de vitaminas es un modelo adecuado para estudios de evolución dirigida.

Biosíntesis de biotina

La biotina es un cofactor esencial de las carboxilasas, transcarboxilasas y descarboxilasas que participan en procesos tan importantes como la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos en todos los organismos vivos (Moss and Lane, 1971). En muchas bacterias incluyendo *E. coli*, la biotina es usada solo por la enzima acetil CoA-carboxilasa en el primer paso para la biosíntesis de ácidos grasos, requiriendo alrededor de 100 a 200 moléculas por célula (Choi-Rhee and Cronan, 2005).

Las rutas metabólicas de esta vitamina ha sido bien estudiadas desde 1967, cuando se describieron las primeras mutantes en los genes de biotina (Del Campillo-Campbell *et al.*, 1967). Actualmente han sido descritas tanto en bacterias como *Escherichia coli* y *Bacillus sphaericus* (Eisenberg, 1987), así como también en hongos y plantas (Baldet *et al.*, 1993). Se ha encontrado que su esquema biosintético es invariante (figura 2) excepto en los primeros pasos para formar pimeloil-CoA, los cuales varían de acuerdo al organismo.

En *Escherichia coli* el operón *bioBFCD* junto con los genes *bioA* (ubicado en la misma región pero que se transcribe en dirección opuesta) y *bioH* (ubicado en otro locus), llevan a cabo la síntesis de biotina (Otsuka *et al.*, 1988). La parte inicial de la biosíntesis no está completamente esclarecida, sin embargo se reconoce la participación de los genes *bioC* y *bioH* mediante los cuales se obtiene el pimeloil-CoA (Barker and Campbell, 1980). En un trabajo integrando la bioinformática, el aspecto estructural y la enzimología, se determinó una función de carboxilesterasa y una baja actividad de thioesterasa para *bioH*. Sugiriendo así que esta proteína condensa unidades de pimeloil (provenientes de *bioC*) con CoA, entonces *bioC* tendría la función de una proteína acarreadora de acilos (Sanishvili *et al.*, 2003)

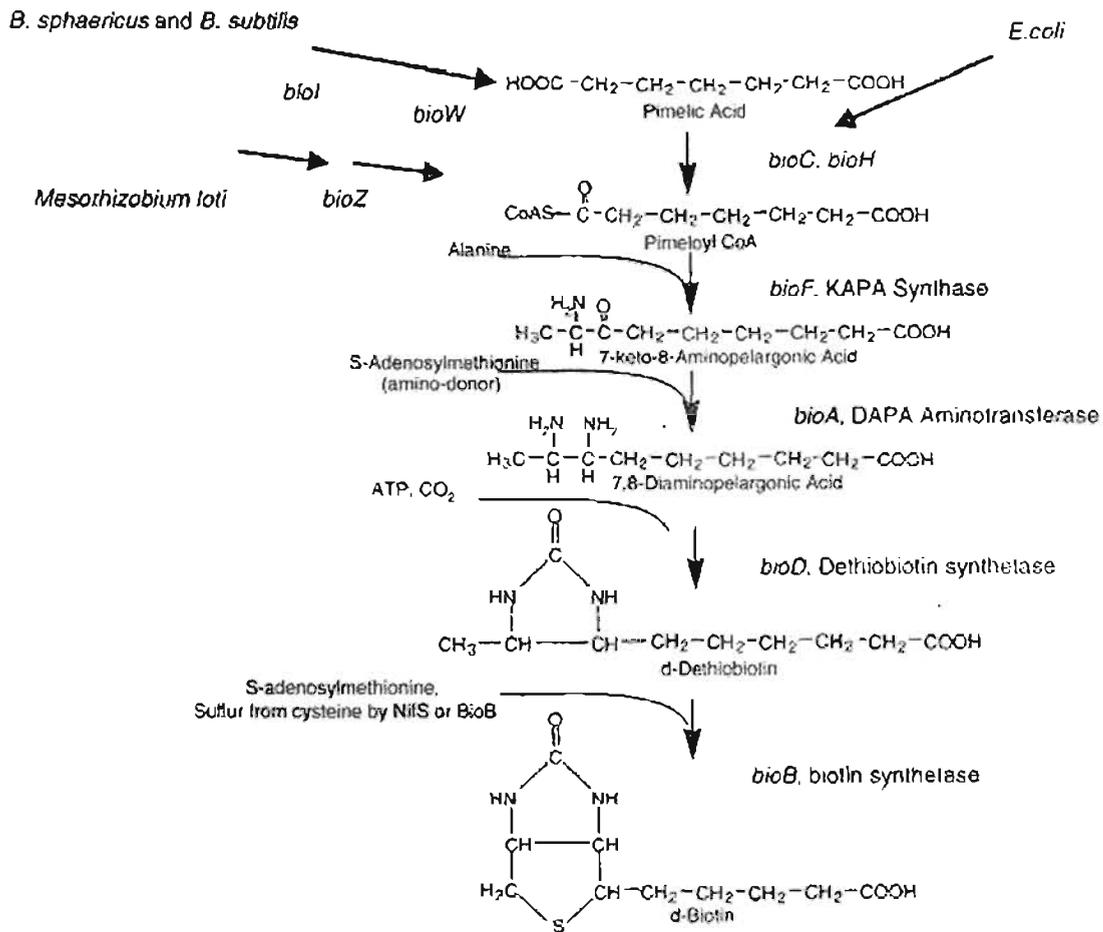


Fig.2 Vía para sintetizar biotina en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. *Mesorhizobium loti* R7A utiliza el producto del gene *bioZ* para sintetizar pimeloil-CoA. En bacterias Gram-positivas, el primer paso en la síntesis de biotina requiere de los genes *bioW* y *bioI*; en Gram-negativas, se necesita *bioC* y *bioH* (Streit and Entcheva, 2003).

El gene *bioF* codifica para la enzima 7-ceto-8-amino-pelargónico sintasa (7-KAPs, EC 2.3.1.47), la cual acopla una molécula de pimeloil-CoA con una molécula de alanina para formar el 7-ceto-8-amino-pelargonato (7-KAP) mediante una condensación descarboxilativa (Eisenberg and Star, 1968)(figura 3).

La secuencia y estructura tridimensional de esta proteína de *E. coli* son conocidas: es un homodímero que presenta un plegamiento α/β clasificada como transferasa dependiente de piridoxal fosfato (Alexeev *et al.*, 1998). Posee tres dominios formados por una mezcla de láminas beta con 7 hélices en el orden 3245671 (figura 4).

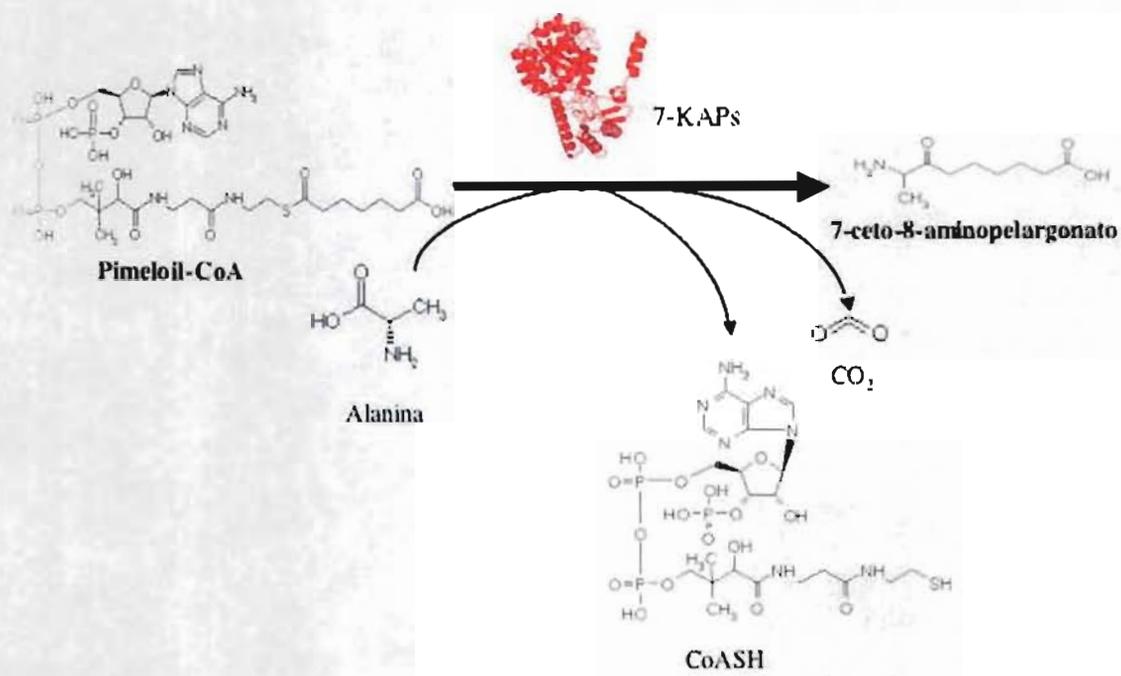


Fig. 3 Reacción catalizada por la enzima 7-KAPs. Los sustratos de la reacción son el pimeloil-CoA y la alanina, la condensación descarboxilativa de éstos por la 7-KAPs produce 7-ceto-8-aminopelargonato con la consecuente producción de CoASH y CO₂.

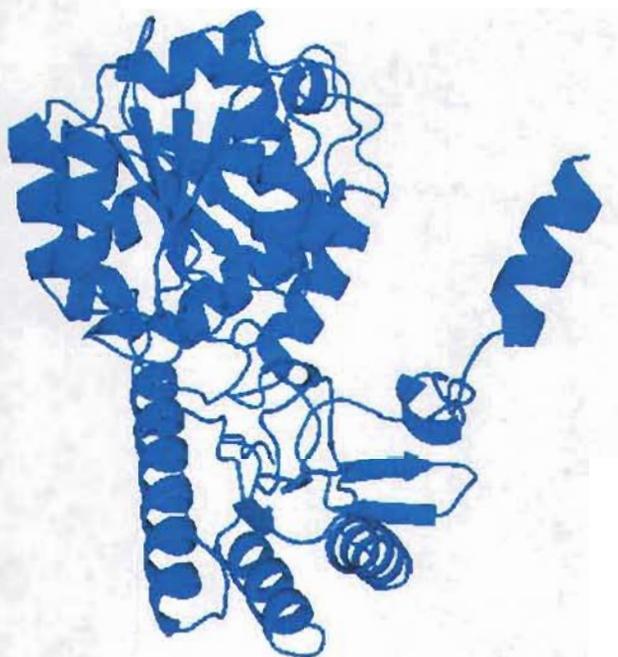


Fig. 4 Estructura tridimensional de la 7-KAPs de *E. coli*. Se puede observar que presenta un plegamiento α/β , está clasificada como una transferasa dependiente de piridoxal fosfato.

El siguiente paso, catalizado por la enzima 7-DAPA sintasa, codificada por el gene *bioA*, es la condensación de una molécula de 7-KAP y una molécula de s-adenosilmetionina para formar 7,8-Diaminopelargonato (7-DAPA). Esta enzima al parecer actúa como un homodímero de 47,403 daltones por cada subunidad, cuya estructura tridimensional ya ha sido resuelta (Kack *et al.*, 1999).

El gene *bioD* codifica para la detiobiotina sintetasa, que es una proteína de aproximadamente 225 aminoácidos y peso molecular de 24,009 daltones, convierte una molécula de 7-DAPA en detiobiotina con la intervención de ATP y CO₂ (Streit and Entcheva, 2003)

Finalmente el gene *bioB* cuyo producto es la biotina sintasa, cataliza la formación de biotina a partir de cisteína y detiobiotina (Pai and Lichstein, 1967). En un trabajo reciente, se determinó que esta enzima al poseer un centro [2Fe-2S] puede servir como donadora de la molécula de azufre necesaria en la reacción para formar biotina, esto es, que la biotina sintasa es reactivo o sustrato de la reacción que ella misma cataliza. Sin embargo, esta donación provoca un desajuste que la hace susceptible al ataque de proteasas durante el lapso de recuperación del centro [2Fe-2S], por lo que tiene un poder catalítico muy modesto, ya que solo se pueden sintetizar *in vivo* de 20 a 60 moléculas de biotina por cada molécula proteica (Choi-Rhee and Cronan, 2005).

La carboxilesterasa de Pseudomonas aeruginosa.

La familia de las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) comprende un grupo de esterasas capaces de hidrolizar enlaces ester-carboxílicos con relativamente amplia especificidad de sustratos. Muestran un alto grado de similitud en secuencia y están involucradas en la degradación de compuestos xenobióticos (Jakoby and Ziegler, 1990) particularmente de pesticidas (Johnson and Talbot, 1983). El hecho de que existan enzimas capaces de participar en el catabolismo de compuestos de reciente aparición, habla de su flexibilidad

para ser reclutadas en nuevas vías, aunque probablemente no con una catálisis muy eficiente (Copley, 2000).

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno con resistencia intrínseca a desinfectantes y antibióticos. El gran tamaño y complejidad de su genoma refleja una adaptación evolutiva a diversos ambientes, con un gran número de genes involucrados en el catabolismo de compuestos orgánicos así como también en la modificación de agentes antimicrobianos (Stover *et al.*, 2000).

La carboxilesterasa de *P. aeruginosa* existe en solución como un monómero activo capaz de hidrolizar cadenas cortas de ésteres de ácidos grasos con una amplia especificidad de sustrato. De acuerdo con el análisis de secuencia posee una triada catalítica conservada Ser-His-Asp (S113, D166 y H197) y un motivo GX SXG de acilhidrolasa dependiente de serina (Pesaresi *et al.*, 2005).

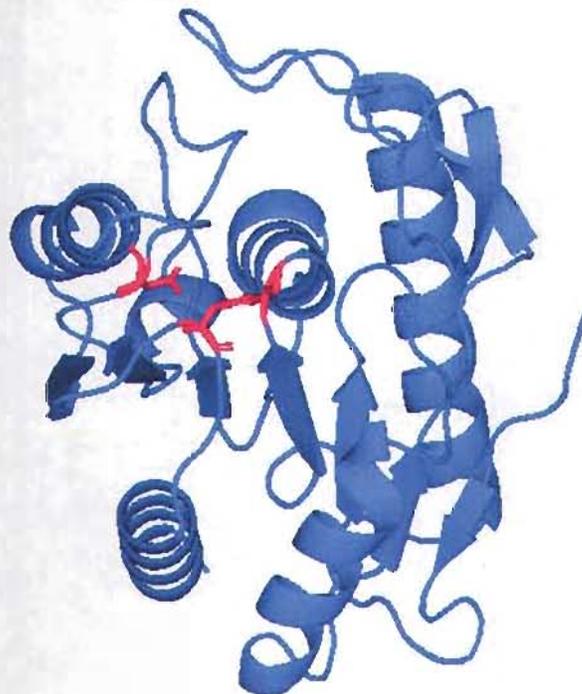


Fig. 5 Modelo estructural de la carboxilesterasa de *P. aeruginosa*. Está clasificada como una α/β hidrolasa. se encuentran marcados en rosa los residuos catalíticos Ser113, Asp166 e His197.

La información actual sobre la estructura tridimensional de la familia de las carboxilesterasa solo se refiere a la proteína humana acil thioesterasa (PDB ID 1FJ2) y a la carboxilesterasa II de *Pseudomonas fluorescens* (PDB ID 1AUO). Con esta última, la carboxilesterasa de *P. auruginosa* presenta un gran parecido en secuencia, ya que tiene un 76% de similitud y un 60% de identidad, por esta razón se pueden inferir la estructura. Presentando un plegamiento de α/β hidrolasa, con tres dominios y con una mezcla de laminas β con 8 hélices en el orden 12435678 (Kim *et al.*, 1997)(figura 5).

Propósitos del proyecto

Los resultados obtenidos en otros laboratorios del mundo han demostrado que un número de cambios limitado, pero que no serían previsibles a simple vista a pesar de conocerse la estructura tridimensional, permiten el aumento de actividad, cambio de especificidad de una proteína y/o llevar a cabo funciones diferentes a la original. Aunque la implementación de estas técnicas es relativamente simple, su éxito depende en gran medida de contar con un método de selección adecuado. Se ha visto a su vez que para llevar a cabo migraciones catalíticas, generalmente se han usado enzimas que están relacionadas filogenéticamente o que participan en la misma vía metabólica por lo que presentan ya cierta afinidad por el sustrato. Al haber obtenido en nuestro grupo de investigación la migración catalítica de enzimas relacionadas estructuralmente el siguiente paso es intentar lograrlo en proteínas que no lo estén.

En este proyecto se propone que una limitante para identificar proteínas mutantes con cambios en el mecanismo de reacción, ha sido el no contar con sistemas de selección lo suficientemente sensibles que permitan detectar actividad enzimática muy baja, lo que se esperaría de una enzima modificada para que lleve a cabo una reacción distinta a la natural. Se propone que la vía de la síntesis de biotina podría ser un sistema adecuado para obtener actividades enzimáticas de *novo* muy pobres, ya que los requerimientos celulares de esta vitamina son excepcionalmente bajos, pero a la vez es indispensable para el crecimiento bacteriano. Así que a través de este trabajo se pretende demostrar que es posible realizar la migración de la actividad enzimática a partir de enzimas que no se encuentran relacionadas

ni en función ni en estructura, por medio de evolución dirigida usando un método de selección sensible. La intención de este proyecto, es generar mutantes de carboxilesterasa de *Pseudomonas aeruginosa* capaces de complementar la auxotrofia de una cepa de *E. coli* ocasionada por la eliminación del gene *bioF*.

Sabemos que la reacción de 7-KAPs como aminotransferasa, básicamente consiste en romper un enlace thioéster para liberar CoA y transferir el grupo amino de la alanina al ácido pimélico. Existe la posibilidad de que la enzima silvestre de carboxilesterasa pueda estar presentando parte de la actividad, ya que para otras carboxilesterasas se ha observado la capacidad de romper este tipo de enlaces en sustratos muy similares al pimeloil CoA (Tsujita and Okuda, 1993). Si éste fuera el caso de la carboxilesterasa de *P. aeruginosa* entonces tendríamos ya una cierta afinidad por el sustrato y posiblemente la primera parte de la reacción, entonces lo que nos faltaría desarrollar sería la transferencia del grupo amino.

Objetivos

Objetivo General

Demostrar experimentalmente que es posible realizar la migración catalítica a partir de enzimas que presentan plegamientos diferentes, por lo tanto que no se encuentran relacionadas filogenéticamente .

Objetivos particulares

Llevar a cabo la migración catalítica a partir de una carboxilesterasa hacia la actividad de 7-ceto-8-amino-pelargónico sintasa (7-KAPs).

Identificación, optimización y caracterización bioquímica de mutantes con posible actividad de 7-KAPs, capaces de complementar la cepa de *E. coli* carente del gene *bioF*.

Hipótesis

Si en la naturaleza se han generado enzimas análogas a lo largo de la evolución, probablemente este proceso se puede simular en condiciones de laboratorio mediante evolución dirigida, empleando como modelo de selección la vía de síntesis de biotina, para migrar la actividad catalítica de una enzima hacia la de otra, que si bien presenta una aparente afinidad por el mismo sustrato, no se encuentra relacionada ni estructural ni funcionalmente.

Adicionalmente se realizó una construcción del gene silvestre clonado en el plasmido pUC18 (figura 7), para emplearlo como templado en la generación de un banco mutagénico en este mismo vector. Así, se llevo a cabo la amplificación del gene de carboxilesterasa por PCR usando los oligonucleótidos pUK5'-GAA-TTC-ATA-AAG-GAG-GCA-ACA-TAT-GAG-CGA-ACC-CCT-GAT-CTC-C y pKK3'- TTT-ATC-AGA-CCG-CTT-CTG-CGT-TCT-G. El primero de ellos posee las modificaciones necesarias para que la enzima pudiera expresarse, además de añadir el sitio *EcoRI* en el extremo 5' del gene, mientras que el segundo hibrida en el vector después del sitio múltiple de clonación. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, para finalmente ser clonado en esos mismos sitios del vector.

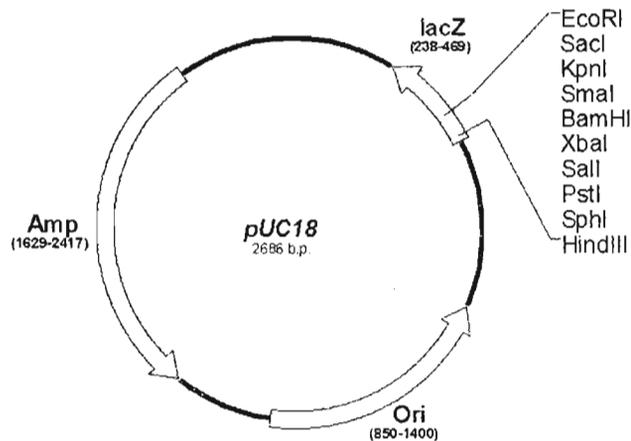


Fig. 7 Vector de expresión pUC18. Se observan en la figura los sitios de restricción de interés y el origen de replicación pMB1ori.

Transformación y selección

Las librerías generadas mediante la metodología descrita se introdujeron por electroporación en una cepa de *E. coli* que carece del gene *bioF*, MC1061 Δ *bioF* F-*araD139* Δ (*ara-leu*) 7696 *galE15 galK16* Δ (*lac*)X74 *rpsL* (Str) *hsdR2* (rk- mk+) *mcrA mcrB1*. Las células recuperadas de cada evento de transformación fueron lavadas con medio mínimo líquido y sembradas en cajas de medio mínimo sólido en ausencia de biotina. Se seleccionaron variantes de *E. coli* capaces de crecer bajo estas condiciones.

En general el proceso de selección de variantes se llevó a cabo de la siguiente manera: Las candidatas seleccionadas se mezclaron y sembraron nuevamente en cajas de medio mínimo para un segundo proceso de tamizaje. De estas cajas se recuperaron las colonias que repitieron el fenotipo y a estas se les extrajo el plásmido que al parecer les confiere la capacidad de crecer, mediante el Kit de Roche (High Pure Plasmid Isolation Kit). Esta mezcla de plásmidos fue reintroducida por electroporación en la misma cepa, para una ronda más de selección. Una vez que se identificaron las colonias con mejor fenotipo, (considerando como mejor las que crecieron más rápidamente), se extrajo nuevamente el plásmido de manera independiente. Los plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, para verificar el tamaño correspondiente al gene de la carboxilesterasa. A este proceso se hicieron algunas modificaciones que dependieron de las particularidades de cada variante.

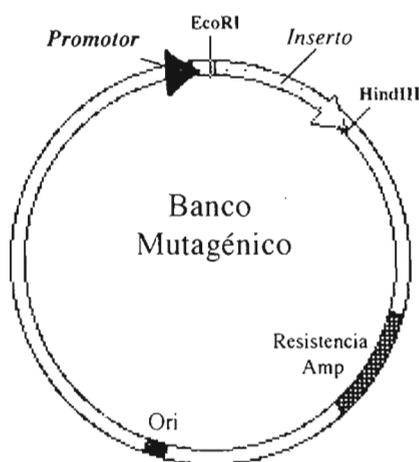


Fig. 8 Esquema de las librerías

Optimización del medio de cultivo

Al existir la posibilidad de que pequeñas cantidades de biotina fueran requeridas para activar la maquinaria metabólica permitiendo así que las enzimas mutantes pudieran desarrollar su nueva actividad; se realizaron pruebas para encontrar la concentración de biotina mínima necesaria en el medio de cultivo para el crecimiento de la cepa $\Delta bioF$ complementada con las mutantes, pero que a su vez bajo esta condición la transformada con los controles negativos como son el vector sin inserto y con la enzima silvestre de

carboxilesterasa fueran incapaces de crecer. Para esto se cultivaron las cepas los controles y las mutantes en cajas de medio mínimo a las cuales se adicionaron diferentes diluciones de biotina. Partiendo de una concentración elevada (10 μ M), se diluyó consecutivamente disminuyendo diez veces la concentración de biotina en cada caja (10 μ M, 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM...) hasta identificar el rango óptimo para nuestra selección.

Para asegurarnos que las concentraciones de biotina manejadas fueran reales y evitar problemas de contaminación, todo el material empleado en la preparación de los medios de cultivo, nunca estuvo en contacto con biotina o fue lavado con mezcla crómica, asimismo se emplearon casaminoácidos libres de trazas de vitaminas.

Caracterización por secuencia

Una vez confirmado el fenotipo de complementación en medio mínimo y la presencia del gene de interés en las clonas seleccionadas, las variantes se secuenciaron en un equipo ABI PRISM 3700 en la unidad de secuencia del Instituto de Biotecnología UNAM, con la intención de identificar las mutaciones responsables de conferir el fenotipo de complementación. Esto se hizo mediante el alineamiento de la secuencia silvestre con las secuencias de las mutantes identificadas usando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997).

Construcción de bancos remutagenizados y recombinación in vitro

Los plásmidos de las diferentes variantes seleccionadas se mezclaron en proporciones iguales. Con la intención de mejorar el fenotipo de las mismas, se plantearon dos estrategias. Por un lado la mezcla de plásmidos fue tomada como templado para la amplificación por PCR mutagénico y generar un nuevo banco remutagenizado. Este proceso se realizó con la intención de explorar mutaciones benéficas en el espacio de secuencia que no aparecieron en la primera ronda de mutagénesis.

Por otro lado, la misma mezcla se empleó para realizar un experimento de recombinación *in vitro* de las variantes, usando el método reportado por Stemmer (Stemmer, 1994b), con la intención de explorar combinaciones de las diferentes mutantes, que en un principio fueron generadas de manera independiente y analizar si estas pueden ser sinérgicas o aditivas. Asimismo realizar la recombinación incluyendo al gene silvestre para eliminar mutaciones que pudieran resultar neutrales o deletéreas (para detalles de la metodología ver apéndice).

Otras construcciones generadas

Para generar construcciones con mutaciones sitio dirigidas, tomando en cuenta cambios que podrían ser informativos, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: Se realizó primero una reacción de PCR, empleando un oligonucleótido que contenía la mutación deseada y que hibridaba con el gene en la región que nos interesaba modificar, se agregó además en la mezcla de reacción el oligo que aparea en uno de los extremos del gene. Este primer producto sirvió como un megaprimer para una segunda ronda de PCR en la que se usó además el oligonucleótido que aparea en el extremo contrario, reconstituyendo así el gene completo pero con la modificación deseada (figuras 19 y 20).

Por otra parte, con la intención de medir la actividad enzimática *in vitro* de las mutantes y compararla con la actividad de la enzima silvestre, todas las candidatas se clonaron en el vector pET28b+ en los sitios *NdeI* y *HindIII*, para su posterior sobreexpresión y purificación por columna de afinidad

Purificación de 7-KAPS

Con la intención de que posteriormente se pueda montar la técnica para medir la actividad de 7-KAPs, empleando un ensayo acoplado reportado por Webster y colaboradores (Webster *et al.*, 2000), se purificó la enzima silvestre. Tomando una construcción del gene silvestre clonado en pET28, se introdujo por choque térmico en células competentes de CaCl₂ de la cepa de *E. coli* BL21. Estas se cultivaron en medio

mínimo líquido, siendo inducidas con IPTG para la sobreexpresión de la enzima de interés. Las células fueron recuperadas y sonicadas para purificar la enzima por afinidad, utilizando un equipo FPLC de purificación por columna de níquel. Posteriormente la enzima pura fue dializada y cuantificada por la técnica de Bradford (ver apéndice).

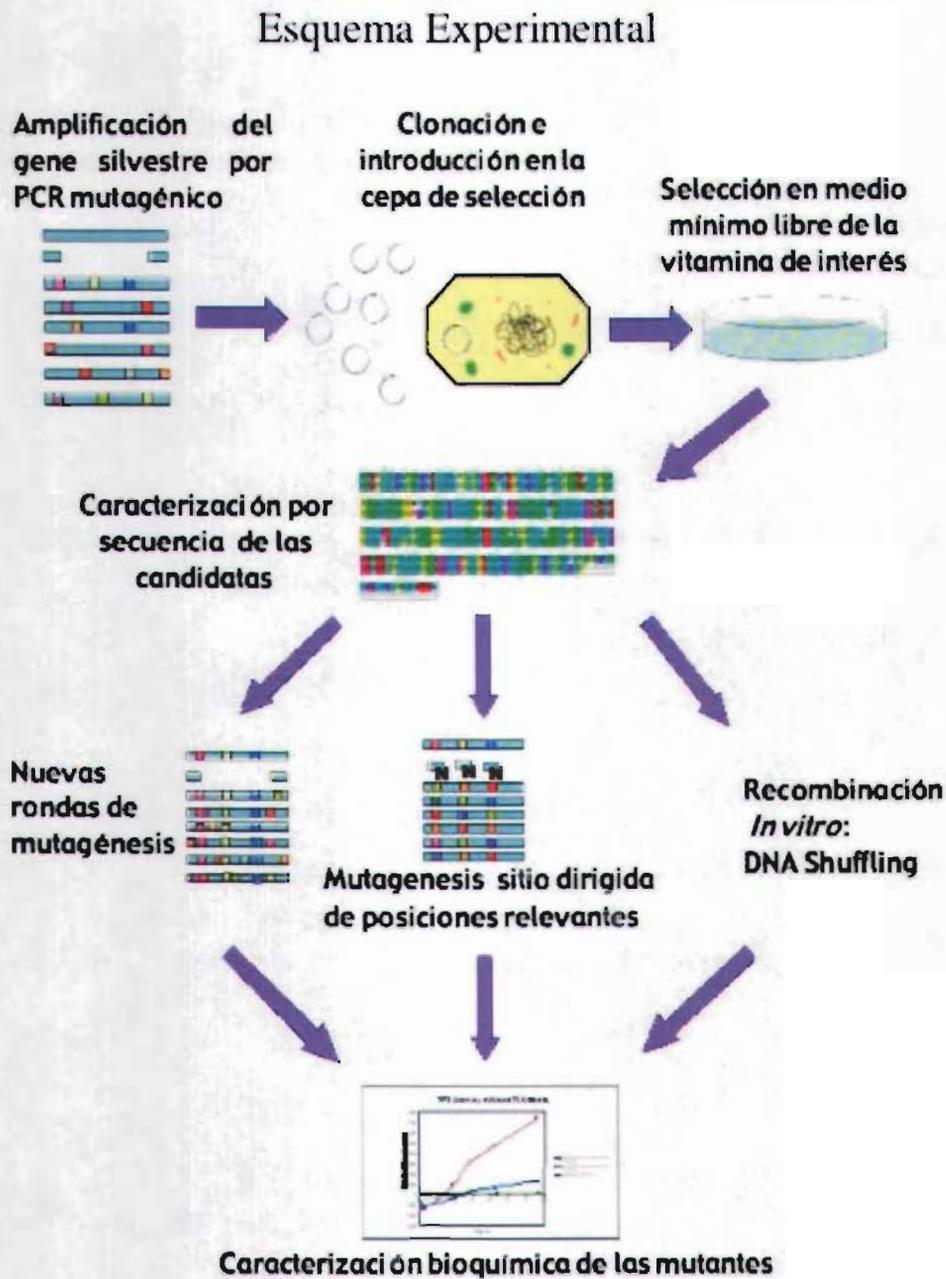


Fig. 9 Esquema general del método experimental.

Resultados

Librerías mutagénicas

Se construyeron tres bancos mutagénicos de carboxilesterasa en el vector pKK223-3, los cuales serán referidos como Bancos 1, 2 y 3. En todos los casos, la cantidad total de variantes se calculó haciendo el conteo de las colonias recuperadas después de transformar la ligación, a éstas se restó el número de colonias obtenidas de una reacción de ligación sin inserto, para descontar el porcentaje de religado del vector. De esta manera se determinó que el Banco 1 presenta aproximadamente 500 mil variantes, el Banco 2 200 mil y el Banco 3 66 mil variantes.

Para tener una aproximación de la tasa de mutagénesis que presentan los bancos, se secuenciaron de cada uno de ellos diez colonias elegidas al azar, cuyas mutaciones se cuantificaron haciendo el alineamiento con el gene silvestre. Se calculó entonces el porcentaje de acuerdo al número de cambios en la longitud total del gene. Con base en esto sabemos que el Banco 1 presentó un 3% de mutagénesis y un 2% los bancos restantes.

Dado que los bancos se construyeron en pKK223-3, al introducirlos en la cepa de selección se observó un lento crecimiento en medio rico (LB) por lo que consideramos la posibilidad de que la sobreexpresión de la proteína pudiera resultar tóxica para la bacteria. Por este motivo se decidió introducir en la cepa el plásmido pREP4 el cual contiene el gene *lacI* que codifica para el represor de P_{lac} , disminuyendo de esta manera la expresión del gene PA3859. Una vez introducido este plásmido, el crecimiento en medio rico fue normal.

También se realizó un banco mutagénico en el vector pUC18 con 33 mil variantes y un 2% de mutagénesis. Esta librería fue hecha con la finalidad de disminuir el estrés metabólico ocasionado por la sobreexpresión, ya que el vector posee un promotor de menor expresión (P_{lac}) que el que presenta pKK223-3 (P_{lac}). Además de disminuir la carga metabólica que conlleva el contener dos plásmidos, ya que este último banco se exploró en una cepa libre de pREP4.

Selección de variantes

Los bancos fueron explorados sembrando en medio mínimo el número de colonias correspondiente a por lo menos tres veces el número de variantes totales en cada uno. Al explorar el Banco 1 se identificaron 20 colonias capaces de crecer en medio mínimo libre de biotina; de éstas se obtuvo plásmido y se digirió para confirmar la presencia del inserto correspondiente al tamaño molecular del gene para la carboxilesterasa (655 pb). Los plásmidos con inserto se mezclaron en proporciones idénticas para ser trabajados conjuntamente, se reintrodujeron a la cepa $\Delta bioF$ y se sembraron nuevamente en cajas de medio mínimo en ausencia de biotina. De esta segunda ronda de selección se identificaron 5 colonias capaces de reproducir el fenotipo. Nuevamente, se corroboró la presencia del fragmento en ellas y éstas fueron secuenciadas. La secuencia reveló que todas representaban a una misma variante, a la que se le denominó CAE16. El fragmento con este gene mutante fue subclonado en una nueva preparación de pKK223-3 para confirmar el fenotipo de complementación (figura 10).

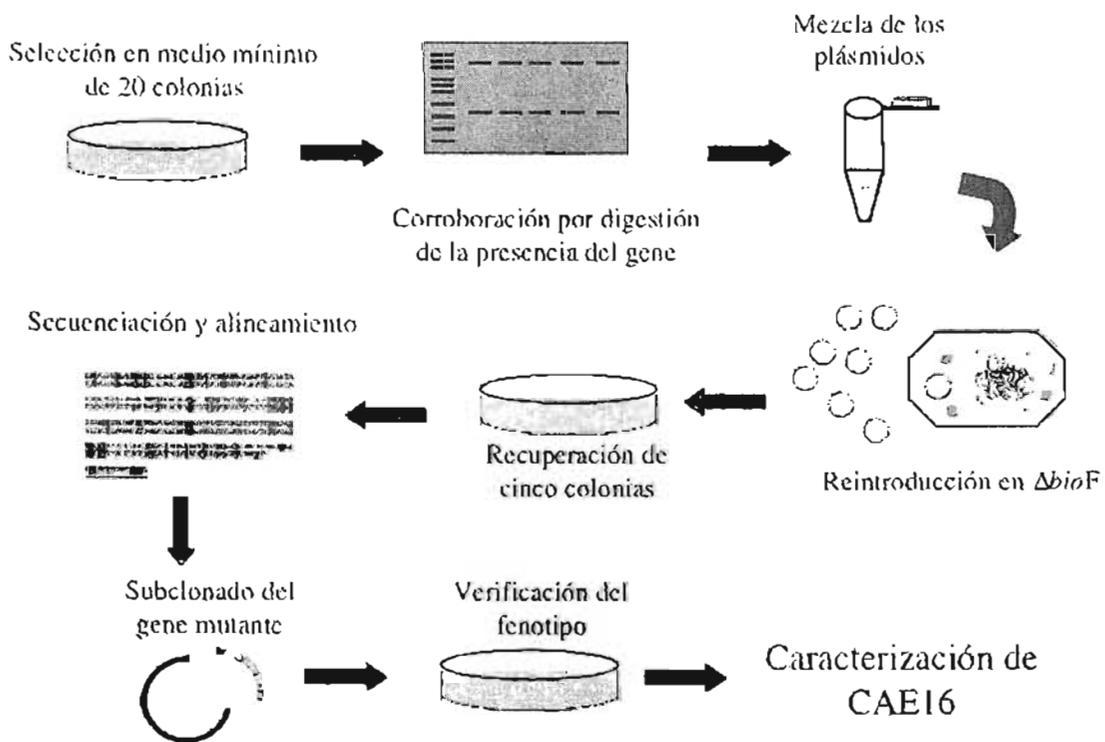


Fig. 10 Proceso de selección de CAE16

De los bancos 2 y 3 se identificaron inicialmente 120 colonias, que se mezclaron en un mismo cultivo y se volvieron a sembrar en medio mínimo. De aquí se seleccionaron 50 colonias que fueron nuevamente mezcladas en cultivo y se les extrajo plásmido. Con este se retransformó la cepa $\Delta bioF$ y se exploró nuevamente en cajas de medio mínimo. De esta selección se recuperaron 5 candidatas que fueron analizadas de manera independiente (figura 11). Después de la última ronda de selección se recuperaron dos variantes (CAE12 y CAE7) capaces de complementar la auxotrofia a biotina y con fenotipo consistente bajo condiciones que serán descritas mas adelante.

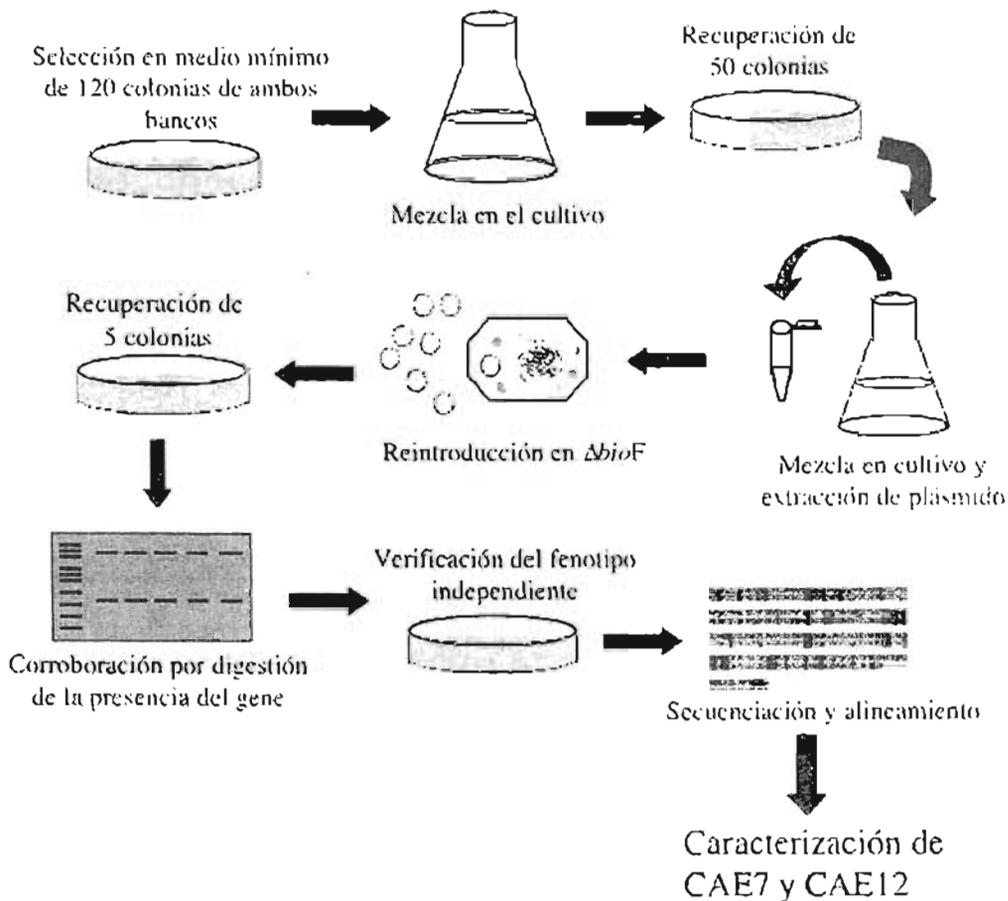


Fig. 11 Proceso de selección de CAE7 y CAE12.

El banco en el vector pUC18 también fue explorado y aunque al principio se seleccionaron algunas candidatas, después de realizar el seguimiento, el fenotipo no resultó consistente en ninguna de ellas. Al no proporcionar candidatas útiles se decidió descartar este banco.

Fenotipo de las variantes

En la figura 12 se observa el fenotipo de las mutantes y el de los controles correspondientes, los cuales son el vector pKK223-3 libre de inserto (PKK) y el gene PA3859 clonado en el mismo vector (CAE01).

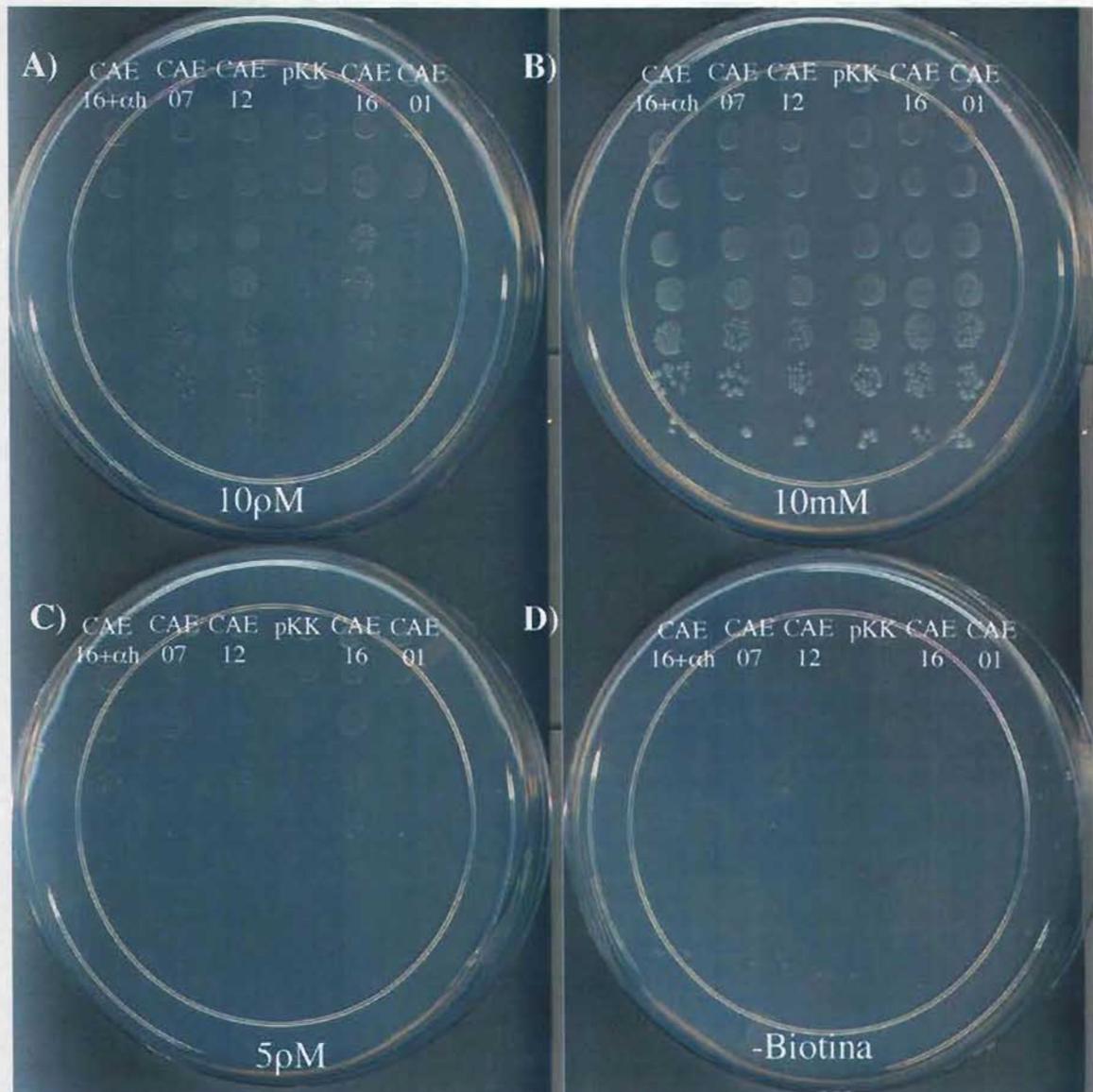


Fig. 12 Fenotipo observado en caja para la cepa $\Delta bioF$ complementada con diferentes construcciones. A) Observamos el crecimiento en 10pM de biotina, B) Caja control positivo con un exceso de biotina (10mM). C) Caja con 5pM y D) libre de biotina. Las cajas fueron incubadas durante 9 días a 37°C, excepto la caja B que fue incubada durante 12 horas. En cada caja, de la parte superior a la inferior, se muestran diluciones 10 veces menores por gota .

De esta manera pudimos constatar el crecimiento de las mutantes activas en la caja de medio mínimo con 10pM de biotina. El fenotipo de crecimiento es consistente bajo estas condiciones. En cambio, una mutante al parecer no activa (CAE16+ α h) y los controles negativos, no logran un crecimiento equiparable a los 9 días de incubación. Como control positivo se presentan todas las transformantes en medio mínimo con un exceso de biotina (10mM). Una vez confirmado el fenotipo las variantes fueron clonadas en el vector pET28b+ para su posterior purificación y determinación de la actividad enzimática *in vitro*.

Características de las mutantes

Al hacer una comparación de secuencias de las variantes con la secuencia del gene silvestre, se identificaron una serie de mutaciones que se presentan en los alineamientos de nucleótidos (figura 13) y de aminoácidos (figura 14). Asimismo se resumen en las tablas 2, 3 y 4.

La mutante CAE16 es una variante que codifica para una proteína de 194 aminoácidos. Con respecto al gene original presenta 26 cambios de nucleótidos, de los cuales 19 son cambios de aminoácidos, 3 cambios a codón de paro (dos en la posición 195 y uno en la 213) y cuatro cambios silenciosos (posiciones 96,155,165 y 176), es decir, cambios de codón que conservan el aminoácido. Debido a los cambios a codón de paro, la proteína mutante es 21 aminoácidos más corta que la proteína silvestre. Esta última posee 215 aminoácidos mientras que la mutante solo 194; así que en total la proteína mutante presenta 16 cambios de aminoácidos. En un análisis más detallado, observamos que cuatro de estos (H20R, L109P, L147P y D 192E) son cambios conservativos en el sentido de que el aminoácido es sustituido por otro del mismo grupo, por lo que la carga característica de la cadena lateral se conserva, aunque si varia el índice de hidropatía (ver tabla 2). Dos cambios más (M38K, V62D) son de aminoácidos hidrofóbicos a hidrofílicos, otros dos (D79G, E105V) de hidrofílico a hidrofóbico. Uno (D28V) de polar a hidrofóbico y tres de hidrofóbicos a polar (P130S, G132S y L137Q). Los aminoácidos polares son más solubles e hidrofílicos que los no polares y los aromáticos, pero son mas hidrofóbicos que los

positivos y negativos. Otro cambio (I108F) fue de hidrofóbico hacia aromático lo que implica que sea ligeramente mas soluble, uno más (F45S) de aromático a polar (ligeramente mas hidrofílico), uno (W61R) de aromático a hidrofílico y finalmente uno de ellos (D88Y) de hidrofílico hacia aromático (hidrofóbico ligeramente cargado).

La mutante CAE12 conserva el tamaño de 215 aminoácidos que posee la proteína original, presenta 12 cambios de nucleótidos de los cuales, 11 conllevan cambios de aminoácidos y un solo cambio silencioso (posición 107). Al analizar estos cambios, se observó que dos de ellos (K30R, S113T) son conservativos, tres más (H20L, H162L, D192G) son de aminoácido hidrofílico a hidrofóbico. También presenta dos cambios de hidrofóbico a polar (A24T, G132S), un cambio (W190G) de aromático a hidrofóbico, uno más (Y140C) de aromático a polar, uno (W61R) de aromático a hidrofílico y finalmente otro cambio (L93F) de hidrofóbico hacia aromático.

La mutante CAE7 también conserva el mismo tamaño que la proteína silvestre, presenta 7 cambios de nucleótidos, de estos, seis derivan en cambio de aminoácidos y un cambio silencioso (posición 134). Con respecto a las modificaciones en la carga de la cadena lateral de los aminoácidos, observamos que dos permanecen (T56S, S73C), hay dos cambios de hidrofílicos a hidrofóbicos (E105V y H205L), uno de hidrofóbico a polar (A50S) y uno más (D179N) de hidrofílico a polar.

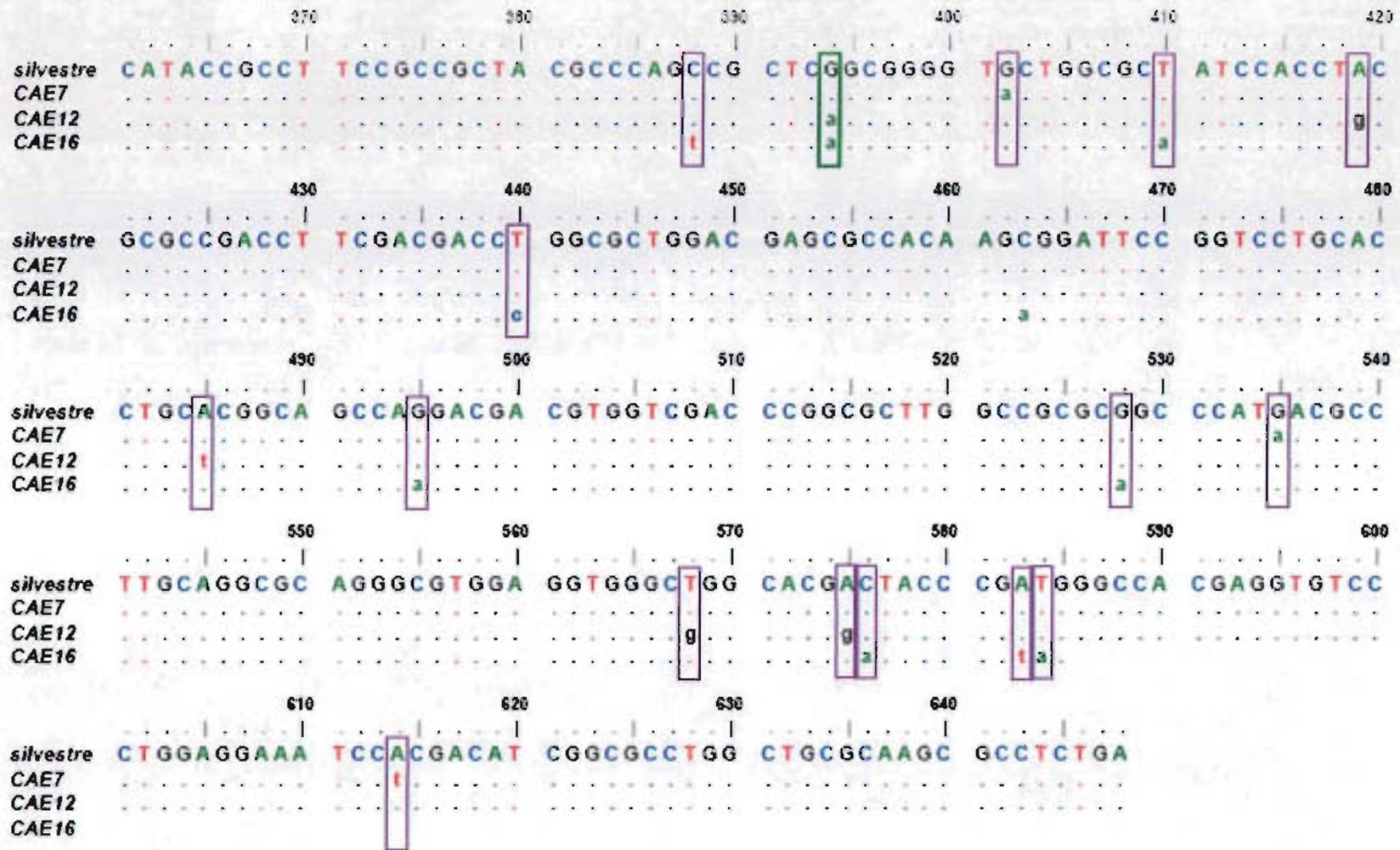


Fig.13 (continuación) . Se encuentran enmarcadas en violeta las mutaciones únicas, en verde las compartidas por dos mutantes.

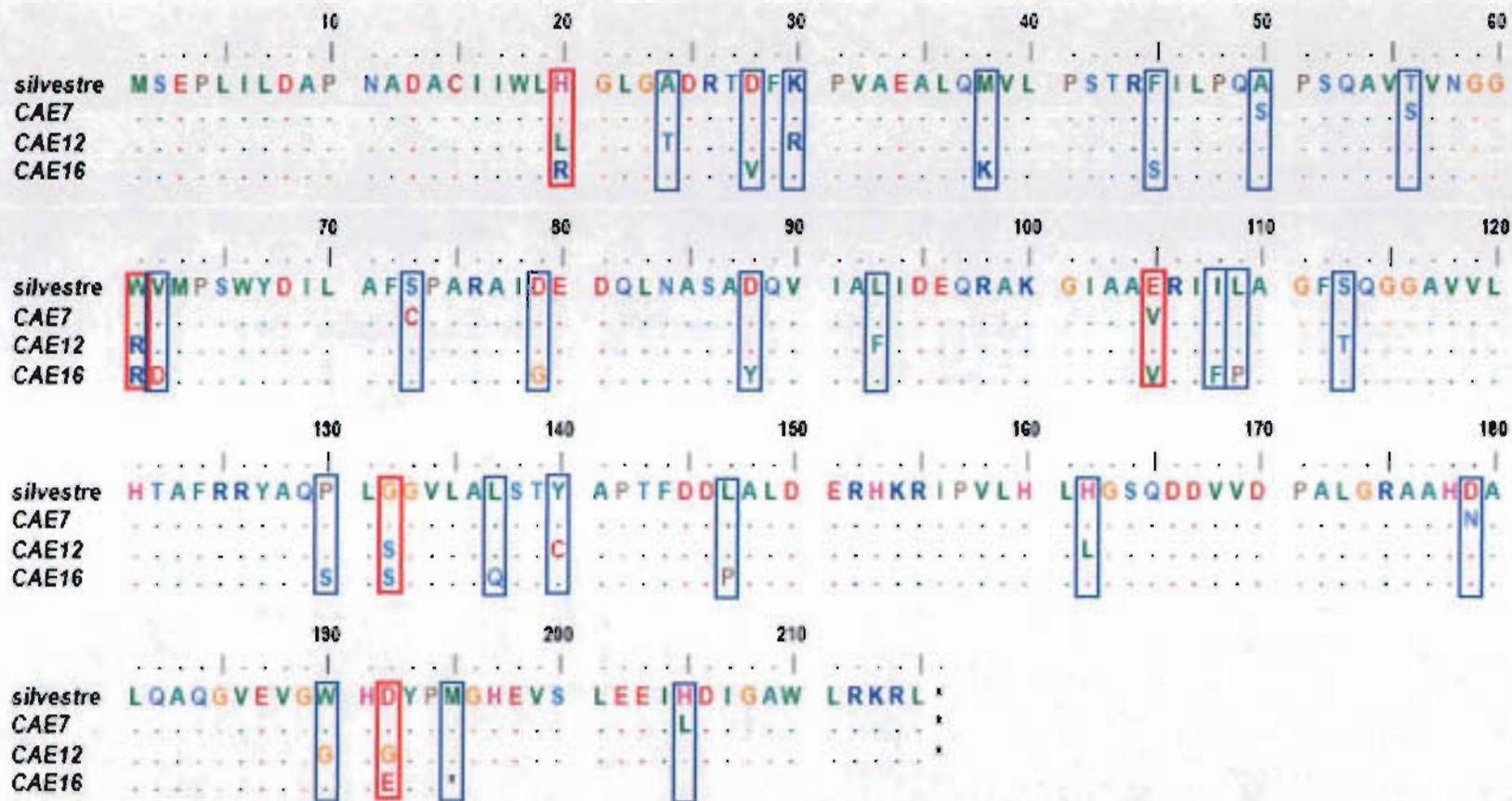


Fig.14 Alineamiento de aminoácidos comparando la proteína silvestre con las mutantes. Enmarcadas en azul se muestran las mutaciones únicas y en rojo las que son compartidas por dos mutantes.

Tabla 2. Comparación de los cambios generados en CAE16 con el gene silvestre.

Silvestre			Mutante CAE16			
Posición	Aminoácido	Indice de hidropatia*	Codón	Aminoácido	Indice de hidropatia*	Codón
20	His	-3.2	CAC	Arg	-4.5	CGC
28	Asp	-4.5	GAC	Val	4.2	GTC
38	Met	1.9	ATG	Lys	-3.9	AAG
45	Phe	2.8	TTC	Ser	-0.8	TCC
61	Trp	-0.9	TGG	Arg	-4.5	AGG
62	Val	-4.2	GTC	Asp	-4.5	GAC
79	Asp	-4.5	GAC	Gly	-0.4	GGC
88	Asp	-4.5	GAC	Tyr	-1.3	TAC
96	Glu	-3.5	GAA	Glu	-3.5	GAA
105	Glu	-3.5	GAG	Val	4.2	GTC
108	Ile	4.5	ATC	Phe	2.8	TTC
109	Leu	3.8	CCT	Pro	1.6	CCT
130	Pro	1.6	CGT	Ser	-0.8	TCC
132	Gly	-0.4	GCT	Ser	-0.8	TCC
137	Leu	3.8	CCT	Gln	-3.5	CAT
147	Leu	3.8	CCT	Pro	1.6	CCG
155	Arg	-4.5	CGG	Arg	-4.5	AGG
165	Asn	-3.5	CAG	Asn	-3.5	CAT
176	Ala	1.8	GCA	Ala	1.8	GCA
192	Asp	-4.5	GAT	Glu	-3.5	GAA
195	Met	1.9	ATG	STOP		TAG
199	Val	4.2	GTC	Ala	1.8	GCG
204	Ile	4.5	ATC	Asp	-4.5	AAC
207	Ile	4.5	ATC	Asp	-4.5	AAC
213	Lys	-3.9	TAG	STOP		TAG

* Escala que se emplea para indicar la tendencia de un aminoácido a estar en contacto con el solvente (valores -) o en ambientes hidrofóbicos (valores +) de acuerdo a los grupos R (Kyte and Doolittle, 1982).

Tabla 3. Comparación de las mutaciones de CAE12 con respecto al gene silvestre.

Silvestre			Mutante CAE12			
Posición	Aminoácido	Indice de hidropatia	Codón	Aminoácido	Indice de hidropatia	Codón
20	His	-3.2	CAC	Leu	3.8	CTC
24	Ala	1.8	GCC	Thr	-0.7	ACC
30	Lys	-3.9	AAG	Arg	-4.5	AGA
61	Trp	-0.9	TGG	Arg	-4.5	CGG
93	Leu	3.8	CTC	Phe	2.8	TTC
107	Ile	4.5	ATC	Ile	4.5	ATA
113	Ser	-0.8	TCG	Thr	-0.7	ACG
132	Gly	-0.4	GGC	Ser	-0.8	AGC
140	Tyr	-1.3	TAC	Cys	2.5	TGC
162	His	-3.2	CAC	Leu	3.8	CTC
190	Trp	-0.9	TGG	Gly	-0.4	GGG
192	Asp	-4.5	GAC	Gly	-0.4	GGC

Tabla 4. Comparación de los cambios encontrados en CAE7 con respecto al gene silvestre.

Silvestre			Mutante CAE7			
Posición	Aminoácido	Indice de hidropatia	Codón	Aminoácido	Indice de hidropatia	Codón
50	Ala	1.8	GCC	Ser	-0.8	TCG
56	Thr	-0.7	ACC	Ser	-0.8	TCG
73	Ser	-0.8	AGT	Cys	2.5	TGT
105	Glu	-3.5	GAG	Val	4.2	GTG
134	Val	4.2	GTC	Val	4.2	GTA
179	Asp	-4.5	GAC	Asn	-3.5	AAC
205	His	-3.2	CAC	Leu	3.8	CTC

Aproximación estructural

En ocasiones tener una visión tridimensional de la localización de los cambios en la estructura, puede resultar informativo para comprender como pudieran estar interactuando ciertos residuos e inferir de alguna manera como participan en la nueva catálisis. Por esta razón se generaron modelos estructurales tanto de la proteína silvestre como de las mutantes empleando el servidor en Internet Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), el cual predice estructuras basándose en la homología con proteínas cuya estructura ha sido resuelta y se encuentra depositada en el PDB (Protein Data Bank). En este caso se basó en la estructura de la carboxilesterasa de *Pseudomonas fluorescens* (clave PDB: 1AUO), cuya longitud es de 217 residuos, dos más que la de *Pseudomonas aeruginosa*. De acuerdo a los datos mostrados por el Swiss-Model, la carboxilesterasa de *P. aeruginosa* presenta un 60.2 % de identidad con la carboxilesterasa de *P. fluorescens*. Las mutantes CAE16, CAE12 y CAE7 presentan un 56.13%, 57.76% y 59% de identidad respectivamente con la carboxilesterasa de *P. fluorescens*. El primero de los modelos correspondiente a la proteína silvestre, ya fue mostrado en la figura 5, el resto se muestran en las figuras 15,16 y 17.

Modelo de CAE16

De acuerdo al modelo (figura 15) se observa que una de las modificaciones más notorias es el codón de paro que la hace más corta, ya que elimina la α -hélice localizada en el extremo carboxilo terminal, dejando al descubierto las hojas β que antes se encontraban al interior de la proteína y donde residen varias de las mutaciones generadas.

En general las mutaciones se encuentran dispersas por toda la proteína, pero si observamos la figura 15, la parte posterior es la que alberga menos mutaciones y la mayoría de ellas se concentra en la parte que queda al descubierto. Además, también se elimina uno de los residuos catalíticos de la función original de carboxilesterasa (H197) ya que el codón de paro recortó también una parte del loop de unión a la última α -hélice, lugar donde se localizaba este residuo.

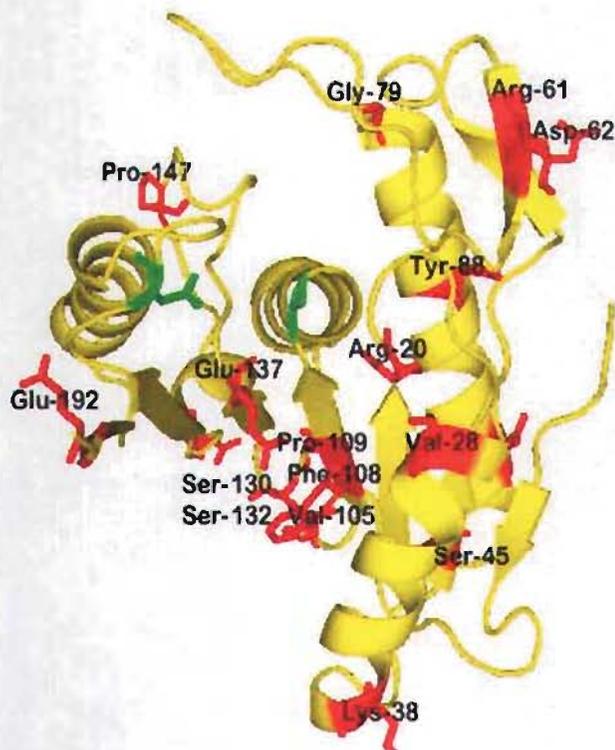


Fig. 15 Modelo estructural de la CAE16. En verde se muestran los residuos que corresponden al sitio activo de la función original, en rojo las mutaciones encontradas.

Modelo de CAE12

En este modelo observamos que la mayoría de las mutaciones están en la superficie y orientadas hacia el frente en la figura 16, asimismo se encuentran rodeando el sitio activo de la función original de carboxilesterasa. También se observa que una mutación está en uno de los residuos catalíticos (posición 113) para la actividad de carboxilesterasa.

Modelo de CAE7

En el modelo de la figura 17 podemos ver que las mutaciones se encuentran en la periferia de la proteína. También se observa que tres mutaciones (A50S, T56S y S73C) se encuentran en los loops de la parte superior, dos en la parte media de las α -hélices ubicadas a la izquierda (D179N y H205L) y solo una mutación (E105V) en un loop por debajo de la proteína.

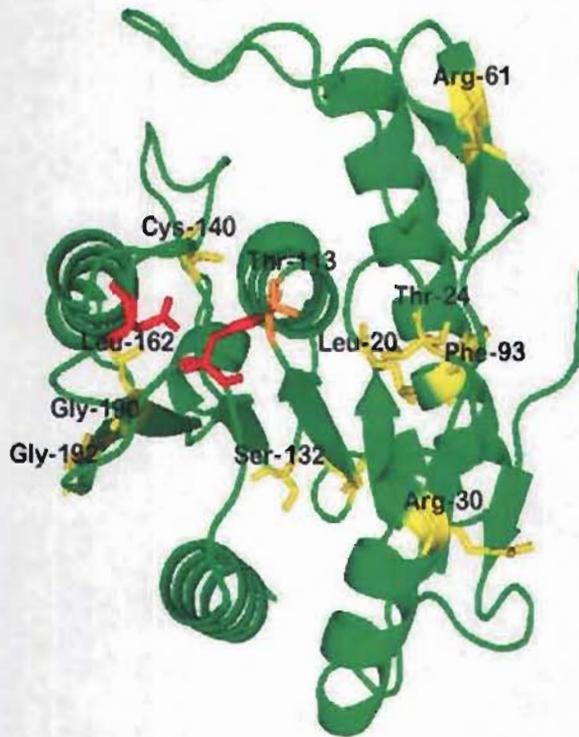


Fig. 16 Modelo de la mutante CAE12 . En rojo se observan los residuos catalíticos, en amarillo se encuentran las mutaciones y en naranja se indica la mutación que coincide con un residuo catalítico.

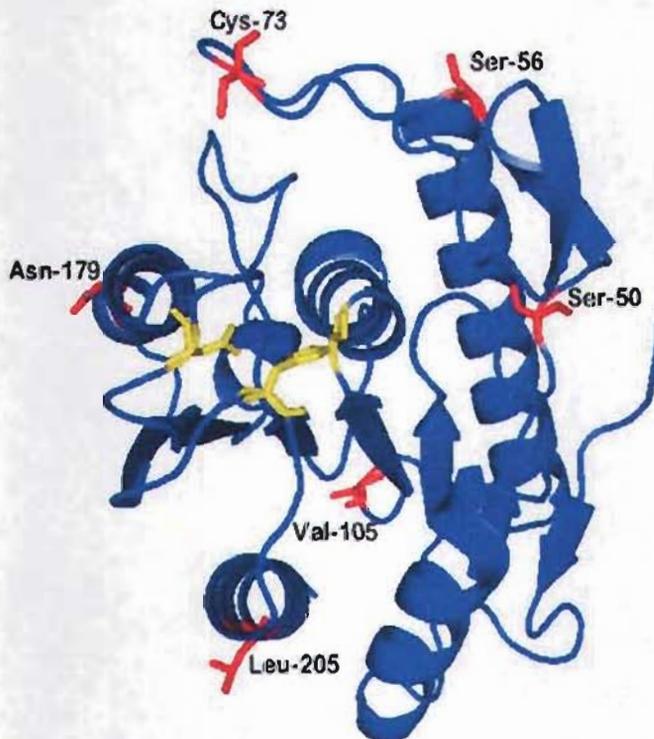


Fig. 17 Modelo de la mutante CAE7. En amarillo se muestra el sitio activo de carboxilesterasa y en rojo las mutaciones identificadas.

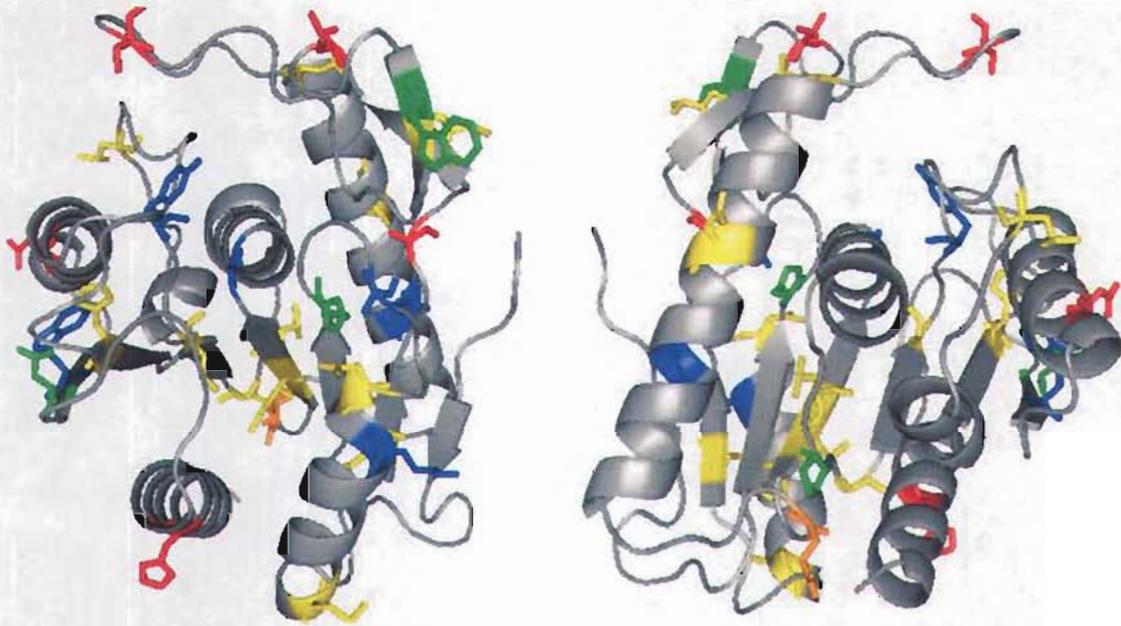


Fig.18 Representación de todas las mutaciones encontradas en las tres candidatas. Se muestran dos perspectivas de la proteína dando un giro de 180°. En amarillo se muestran las mutaciones en CAE16, en azul las identificadas en CAE12, en rojo las de CAE7. Las mutaciones que comparten la misma posición en dos de las variantes se indican en verde (compartidas por CAE12 y CAE16) y en naranja (compartidas por CAE16 y CAE07).

Bancos remutagenizados y recombinación in vitro

La primera mutante identificada fue CAE16, así que se comenzó a trabajar independientemente sobre ella. Al ver que presentaba una gran cantidad de mutaciones, explorar nuevos cambios benéficos sobre esta variante resultaba muy difícil, por lo que la primera intención fue limpiarla de los cambios neutrales o deletéreos. Para esto se construyó un banco por recombinación *in vitro* mediante “DNA shuffling” de el gene silvestre y la mutante. La librería obtenida fue de tres mil variantes y se observó que hubo al menos dos eventos de recombinación cuyos fragmentos oscilaban de entre 150 a 200 pares de bases aproximadamente. Esta librería fue explorada y aunque inicialmente se seleccionaron algunas candidatas el fenotipo por el cual fueron seleccionadas no fue reproducible.

Después de presentarse estos problemas se decidió generar nuevos bancos (2 y 3) con un menor porcentaje de mutagénesis, de los que se seleccionaron CAE12 y CAE7, junto con otras candidatas que parecían reproducir el fenotipo, estas dos candidatas y tres más fueron mezcladas y sometidas al proceso de recombinación. De aquí se generaron dos pequeños bancos, uno de 122 mil y otro de 30 mil variantes. Al analizarse no arrojaron candidatas con fenotipo reproducible. También de la mezcla de estas variantes se construyó un banco remutagenizado que resultó ser de 300 mil variantes, pero no proporcionó mutantes con un mejor fenotipo.

Otras construcciones generadas

Al analizar los modelos estructurales y ver la pérdida del α -hélice en la variante CAE16, consideramos que era una modificación importante, por lo que se construyeron dos mutantes introduciendo los cambios de manera sitio dirigida. Por un lado se construyó la mutante CAE16+ α h, la cual conserva todas las mutaciones encontradas en CAE16 excepto el codón de paro prematuro, reconstituyendo así el α -hélice (figura 19). Esta mutante fue clonada tanto en el vector pET28b+ como en pKK223-3, su fenotipo lo podemos observar en la figura 12, en la cual no se aprecia crecimiento en medio mínimo con bajas concentraciones de biotina ni en el libre de ella.

Por otra parte se construyó también la mutante CAE01- α h, esta variante es básicamente la proteína silvestre cuya única mutación es el codón de paro, por lo que no posee el α -hélice final (figura 20). Esta mutante fue clonada únicamente en pET28b+ con la finalidad de ser purificada y verificar su actividad *in vitro*.

Debido a la aparición de las candidatas CAE12 y CAE7 que no poseen el codon de paro, se decidió explorar las nuevas opciones. Las mutantes CAE16+ α h y CAE01- α h se dejaron para la posterior medición de la actividad *in vitro* en cuanto se montara el ensayo.

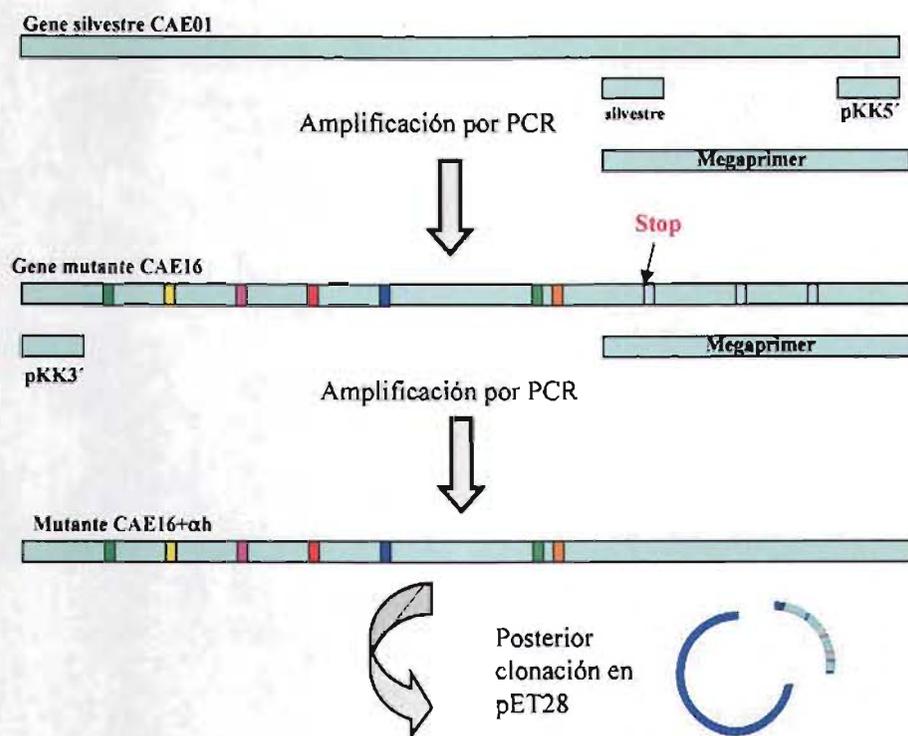


Fig. 19 Esquema de cómo se realizó la construcción de la mutante CAE16+αh.

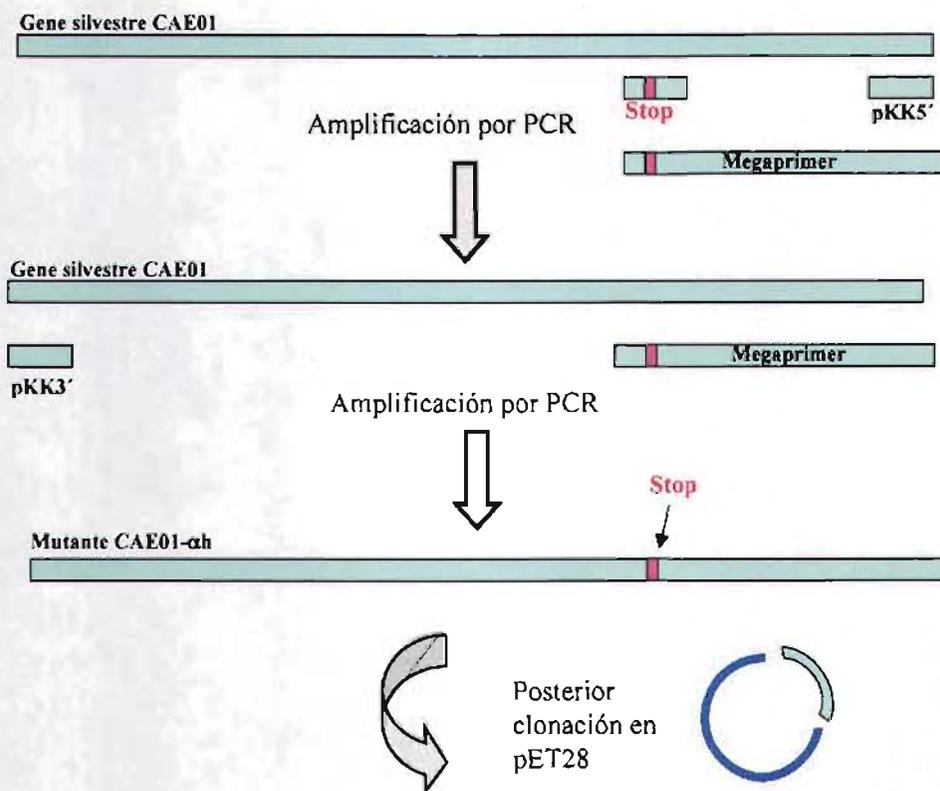


Fig. 20 Esquema de cómo se realizó la construcción de la mutante CAE01-αh.

Purificación de la enzima 7-KAPs

Para comenzar a montar el ensayo enzimático y poder medir la actividad *in vitro* de las mutantes con respecto a la actividad de 7-KAPs, esta enzima fue purificada en un FPLC usando una columna de afinidad de níquel. En la figura 21 se muestran diferentes fracciones recuperadas de la purificación, las mejores fueron dializadas conjuntamente, cuantificadas y almacenadas con 100 μ M de piridoxal fosfato. Con esta enzima se hicieron ensayos preliminares, en los que presentamos problemas para reproducir los resultados y en los que la enzima no presentaba un comportamiento michaeliano, estas inconsistencias fueron atribuidas a la impureza de uno de los sustratos para la reacción.

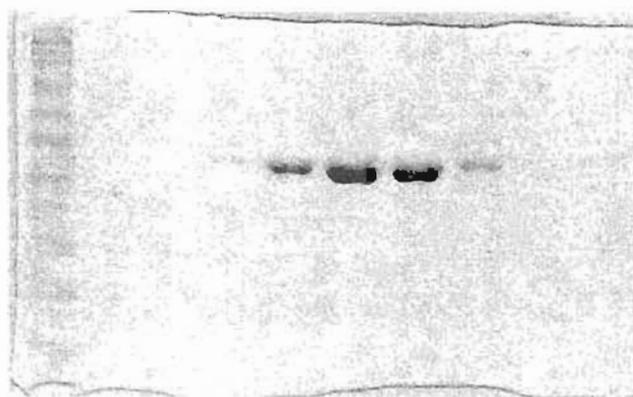


Fig. 21 Enzima 7-KAPs purificada. Se muestran las fracciones recuperadas de la purificación. De acuerdo con la cuantificación por Bradford la concentración de la proteína purificada que finalmente recuperamos es de 0.5 μ g/ μ l.

Discusión

Características de las librerías mutagénicas

Existen dos parámetros principales para evaluar la diversidad de una librería mutagénica: el tamaño y la tasa de mutagénesis.

Para el caso de nuestras librerías, el tamaño calculado de los bancos 1 y 2, se encuentra dentro del rango aceptable, ya que de acuerdo con Schmindt-Dannert (2001), el número de variantes generadas en un banco por PCR mutagénico debe de ser de 10^4 a 10^6 . Cuando se emplean métodos de selección basados en “screening” la capacidad de análisis suele ser limitada por lo que no se exigen bancos muy grandes, mientras que en el caso de la selección positiva es posible analizar un número mucho mayor de variantes. Lo que se busca entonces en un banco es que sea lo suficientemente grande como para que haya probabilidad de obtener variantes exitosas, pero asimismo que no sobrepase la capacidad de análisis. Nuestra intención fue entonces ubicarnos dentro de este límite.

En el caso del banco 3 y el generado en el vector pUC18, son un orden de magnitud menores a lo recomendado. A pesar de esto decidimos hacer la exploración, por la necesidad de revisar el mayor número de variantes posibles, pero el tamaño reducido fue probablemente la razón por la cual no obtuvimos candidatas exitosas de estos dos bancos.

Con respecto a la tasa de mutagénesis, para el caso del banco 1 resultó ser cercana al 3%, y para el resto de los bancos del 2%. El porcentaje de mutagénesis necesario depende de las particularidades de la proteína con la que se esté trabajando y hacia donde se quiere llegar. En un caso en el que la actividad buscada sea similar a la original, es probable que unos pocos cambios sean suficientes para llegar a ella. En nuestro caso no podíamos saber la tasa de mutagénesis que necesitábamos, debido a la diferencia en la actividad y estructura de las enzimas con las que trabajamos.

Normalmente se trabaja con frecuencias bajas de mutagénesis, por tres motivos principales. Primero por la idea de que la evolución natural se da por la acumulación lenta y gradual de cambios genéticos. Segundo, porque la extensa mayoría de las clonas que provienen de librerías con una alta tasa de mutagénesis pueden resultar no funcionales. Tercero, debido a que con altas frecuencias de mutagénesis el espacio de secuencia se incrementa enormemente, una muestra de estos bancos resulta muy ambigua o poco representativa (Daugherty *et al.*, 2000).

Existen algunos trabajos en los que a partir de librerías con alta frecuencia de mutagénesis, se han podido aislar variantes activas, sobre todo en aquellos en los que se requiere de una gran diversidad para obtener el objetivo (Christians and Loeb, 1996; Daugherty *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 1996; Zaccolo and Gherardi, 1999). De acuerdo con estas referencias, las librerías de este tipo pueden llegar a tener un número de mutantes útiles mayor al esperado además de que la diversidad se incrementa, sugiriendo también que para ciertos casos una “hipermutagénesis”, no significa necesariamente llegar a la inactivación de la secuencia, por lo que se pueden explorar múltiples interacciones entre mutaciones que serían inaccesibles a una baja tasa de mutagénesis. Estas interacciones pueden ser sinérgicas incrementando la función directamente, o que una o algunas mutaciones incrementen la función mientras que el efecto negativo de ellas en la estabilidad estructural, sea suprimido por mutaciones estabilizadoras en cualquier región de la proteína, mediante un fenómeno parecido a la epistasia (Drummond, en prensa). El hecho de que el espacio de secuencia se incremente con altas tasas de mutagénesis resulta para nuestros intereses más una ventaja que una desventaja. Al igual que los grupos de investigación que han trabajado bajo estas condiciones, en nuestro caso se logró aislar variantes funcionales.

Sistema de selección

El método de selección empleado se basa en la selección positiva, es decir, que solo podrían crecer aquellas bacterias que tuvieran un medio por el cual obtener biotina, asumiendo la sustitución de la función de 7-KAPs para producirla a través de la enzima mutante de carboxilesterasa que le proporcionamos. Este planteamiento se apoya en la

observación de que los controles negativos como son la cepa $\Delta bioF$, la cepa transformada con pKK223-3 sin ningún inserto y la que contiene al gene silvestre de la carboxilesterasa no son capaces de crecer en medio mínimo carente de biotina o con las pequeñas cantidades que de ésta agregamos en los experimentos finales, lo cual elimina la posibilidad de que en estas condiciones exista la actividad. Otra manera para asegurarnos de que el fenotipo de crecimiento en medio mínimo es debido a la proteína mutante, fue mediante la reintroducción del gene mutante en la cepa $\Delta bioF$, así se elimina la posibilidad de que el crecimiento observado se pueda deber a alguna característica independiente de la construcción seleccionada e intrínseca de las células empleadas en ese momento. Y para el caso de CAE16 se realizó el subclonado del gene, lo que eliminaba la posibilidad de que el fenotipo se deba a alguna modificación en el vector de expresión.

A pesar de esto, durante la selección identificamos una gran variedad de candidatas que finalmente no repetían el fenotipo, por lo que hubo la necesidad de realizar varios pasos de tamizaje y modificaciones en el medio de cultivo, para finalmente quedarnos con las mutantes con fenotipo consistente.

Una explicación sobre la aparición de estos falsos positivos en las primeras rondas de selección, puede ser la cantidad de células plaqueadas en cada caja. Esto es, que de las variantes recuperadas en la electroporación se sembraron alrededor de tres mil colonias por caja con la intención de que estuvieran bien distribuidas. Sin embargo, tomando en cuenta que muchas de las células mueren en el momento de la transformación, planteamos la hipótesis de que éstas liberan la biotina que contienen, entonces las células vivas toman esta biotina y pueden llegar a crecer. Así cuando se desea corroborar el fenotipo nuevamente (ya sea en mezcla o de manera independiente) en un menor número de células, ya no se observa crecimiento.

Por otro lado, existía también la posibilidad de que pequeñas contaminaciones con trazas de la vitamina, estuvieran provocando la aparición de falsos positivos, lo que nos llevó a ser más estrictos en la preparación del medio de cultivo para eliminar cualquier contaminación. Al modificar la preparación empleando material nuevo o lavado con

mezcla crómica y usar casaminoácidos libres de trazas de vitaminas, se dejó de observar el crecimiento de las falsas positivas e incluso el de la mutante CAE16 de la que estábamos seguros de su fenotipo y se había hecho el subclonado del gene corroborando la observación.

Para el caso de la síntesis de tiamina, en nuestro grupo de investigación se ha observado la necesidad de trazas de esta vitamina para el crecimiento de mutantes de MonoTIM con actividad catalítica de ThiE comprobada *in vitro* (datos no publicados). Por esta razón surgió la hipótesis de que pequeñas cantidades de biotina fueran requeridas para activar la maquinaria metabólica, permitiendo así que las actividades vestigiales de las mutantes puedan complementar, lo que correlaciona con los resultados obtenidos al emplear una concentración 10pM de biotina en el medio de cultivo. La argumentación principal de este hecho, es que las vitaminas son esenciales en la célula para procesos centrales, así que si desde un inicio la célula no encuentra una relativa estabilidad metabólica, no puede llegar a la producción de proteínas, lo cual implica no producir las enzimas mutantes para complementar la función.

Una hipótesis mas específica está relacionada con el papel de la biotina, sabiendo que es un cofactor esencial en el primer paso de la síntesis de ácidos grasos (Streit and Entcheva, 2003). Con el planteamiento de la posible función de BioH y BioC en *E. coli*, realizada por Sanishvili y colaboradores (descrita en la introducción), se puede asumir que el sustrato de la reacción empleada como modelo, es decir, el pimeloil-CoA, proviene de la condensación del ácido pimélico y CoA. Esto es, *bioC* fungiendo como una acarreadora de acilos para formar ácido pimélico y *bioH* como la condensadora del ácido con CoA (Sanishvili *et al.*, 2003). Si esto es cierto, tendríamos también como limitante la producción del sustrato de la reacción que buscamos complementar, ya que la primera enzima participante en la formación del ácido pimélico, la acetil CoA carboxilasa, no tendría presente al cofactor necesario (figura 22).

Así que si no existiera una mínima cantidad de biotina no sería posible producir la proteína mutante y probablemente tampoco el sustrato de la reacción, pero una vez activado

el sistema, la enzima se produce y complementa la función, mientras que en el caso de los controles negativos la pequeña cantidad de biotina en el medio no es suficiente para hacer crecer a la bacteria.

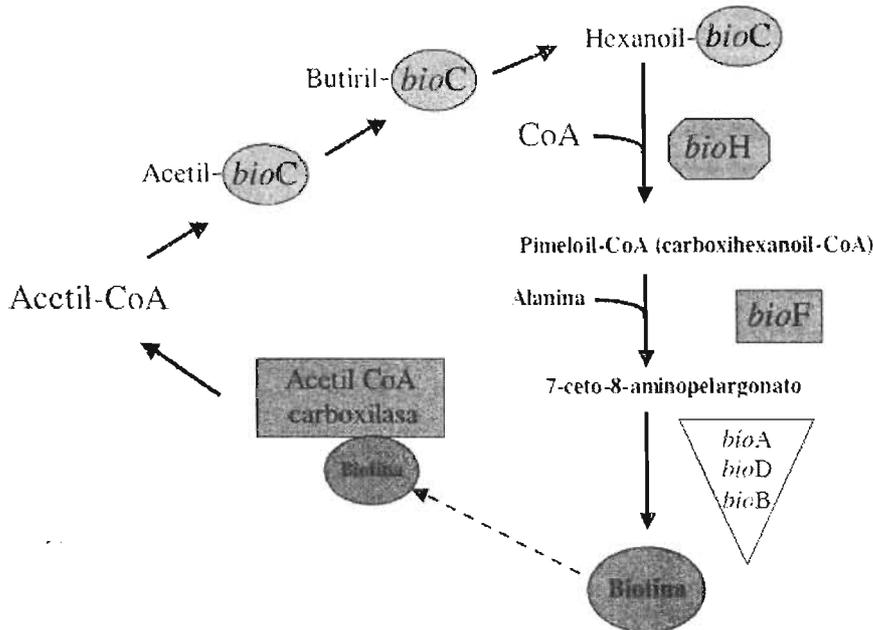


Fig. 22 Esquema de la retroalimentación en la ruta de síntesis de biotina.

Sabemos que un aspecto crítico en la evolución dirigida es la aplicación de un esquema de selección óptimo, el cual debe ser lo suficientemente astringente para distinguir las moléculas que poseen las características deseadas de las que no. Por otro lado, el esquema de selección también debe ser altamente sensible, porque se espera que las moléculas con las propiedades deseadas sean muy raras en la población además de ser poco eficientes, permitiendo así que sean recuperadas y amplificadas posteriormente en la progenie (Joyce, 2004). Esto indica que es necesario encontrar una condición que combine de manera eficiente selectividad y astringencia, para tener un buen método de selección.

Estamos concientes de que nuestro método de selección es muy sensible, pero esta alta sensibilidad podría estarle reduciendo la astringencia por lo que identificamos una gran cantidad de falsos positivos. En general y más aun en este contexto se vuelve

fundamental la reproducibilidad del fenotipo, que en el caso de las mutantes reportadas ha sido observado en reiteradas ocasiones, en lo cual nos apoyamos para decir que se ha logrado la migración catalítica.

Características de las mutantes y su optimización

Como consecuencia de la alta tasa de mutagénesis en las librerías, las variantes seleccionadas presentan muchas mutaciones, tomando en cuenta que normalmente el número de cambios útiles, es decir, los que confieren la nueva característica se reducen a unos cuantos (Schmidt-Dannert, 2001; Williams *et al.*, 2004). Por esta razón se infiere que algunos de los cambios no están involucrados en la actividad, así que podrían ser neutrales o incluso deletéreos, afectando negativamente a la proteína, pero también, como se había mencionado algunas mutaciones aunque no involucradas en la nueva catálisis pueden estar sirviendo como estabilizadoras. Es difícil discernir estos cambios en una simple revisión de la secuencia, aunque al observar los alineamientos resulten interesantes las mutaciones que coinciden en la misma posición en por lo menos dos de las mutantes, la información no resulta tan contundente como para afirmar que están directamente involucrados en la función, debido a que algunas de estas posiciones podrían ser sitios susceptibles a mutación, por estas razones surge la necesidad de plantear estrategias para la segregación e identificación de las relevantes para el fenotipo.

Intentamos eliminar los cambios innecesarios de la variante CAE16 haciendo un experimento de recombinación *in vitro* de esta mutante con el gene de la proteína silvestre por DNA shuffling, sin encontrar mutantes con mejor fenotipo al observado, probablemente porque aunque sí hubo eventos de recombinación, el número de variantes fue muy reducido y los fragmentos que se lograron recombinar eran de gran tamaño, impidiendo así separar mutaciones cercanas. Este último punto se debió a que no pudimos obtener un reensamble de fragmentos menores a 100pb, como se ha empleado en otros trabajos para incrementar la eficiencia de recombinación (Stemmer, 1994a). Debido a la cantidad de mutaciones se consideró inconveniente emplear esta mutante para nuevas rondas de mutagénesis, evitando así el riesgo de inactivar la proteína.

En el caso de CAE12 y CAE7 fueron identificadas junto con otras tres mutantes que parecían también ser activas, las cinco fueron utilizadas para una reacción de DNA shuffling que no generó mejores candidatas. A pesar de que sí se presentaron eventos de recombinación, los fragmentos también fueron grandes y el número de variantes fue pequeño. Posteriormente, las tres mutantes adicionales empleadas en la reacción, resultaron no ser capaces de reproducir el fenotipo deseado. Así que exploramos un banco que contenía una contaminación de mutantes no activas, lo que redujo las probabilidades de mejorar el fenotipo. Lo mismo ocurrió entonces con los bancos remutagenizados, en los que además al tener muchas mutaciones, el introducir nuevas favorece que predominen variantes no funcionales cuando se sobrepasa la cantidad de mutaciones toleradas por la proteína. Sin embargo estos bancos se construyeron por la posibilidad de encontrar nuevas mutaciones benéficas.

Además de los argumentos presentados, cabe mencionar que existen trabajos en los que a pesar de dar nuevas rondas para producir variabilidad, tampoco les ha sido posible encontrar mutantes con una mejor actividad, lo cual ha sido atribuido en parte a la resolución del método de selección (Oh *et al.*, 2002; Peimbert and Segovia, 2003). Lo que sugieren estos casos es que los métodos de selección poseen un límite en la capacidad de detección.

Aspecto estructural

Existen diferencias entre las tres mutantes con respecto a la localización de los cambios y es difícil discernir por su ubicación cuales de ellos podrían modificar la función, debido a que se encuentran distribuidos a lo largo de toda la proteína. A pesar de esto resultan interesantes las mutaciones que se repiten en diferentes variantes, las que se encuentran rodeando el sitio activo y/o en la hendidura de acoplamiento del sustrato original, así como también el cambio radical en CAE16.

Dentro de las características estructurales de CAE16 uno de los cambios más importantes es la eliminación del α -hélice ubicada en el extremo carboxilo terminal y a su vez la gran cantidad de mutaciones que se concentran en las hojas β que quedan al descubierto. Esto abrió dos posibilidades: por un lado esta modificación podría estar afectando la estabilidad de la proteína al dejar expuestos residuos hidrofóbicos que anteriormente se encontraban protegidos en el interior, o que la pérdida de esta estructura pueda contribuir a la apertura de un espacio en el que se acople el nuevo sustrato. Por esta razón se decidió hacer dos construcciones adicionales, una de ellas consta de todas las mutaciones presentes en CAE16 pero con el α -hélice reconstituida. Al probar el fenotipo, esta construcción no fue capaz de complementar, así que se pensó entonces que la pérdida de esta estructura era un cambio importante para la nueva función. A la par de esta construcción, también fue hecha una de la proteína silvestre cuya única modificación fue el codón de paro, eliminando así el α -hélice del extremo carboxilo terminal. Esta construcción se prefirió dejarla para que posteriormente fuera probada su actividad *in vitro*, principalmente por el hallazgo de las otras mutantes en las que esta mutación no estaba presente, indicando así que esta modificación no resultaba tan importante para obtener la nueva función o que existían otras vías para lograrlo. Hasta el momento desconocemos el fenotipo que confiere esta proteína a la cepa $\Delta bioF$.

En CAE12, la mutación que más llama la atención es la que se localiza en uno de los residuos catalíticos de la función original, debido a que como mencionamos existe la posibilidad de que estos residuos pudieran continuar participando en la nueva catálisis. También resultan interesantes las mutaciones que coinciden con CAE16 (Posiciones 20, 61, 132 y 192). En CAE7 las mutaciones están distribuidas en distintas regiones de la proteína pero todas son superficiales y solo un residuo coincide con la mutante CAE16 (Val105). Sería imprudente sacar conclusiones de las diferencias en estos modelos estructurales ya que los caminos para llegar a la nueva actividad pueden ser diversos. Cuando se realizó la sobreposición de los modelos (figura 18) para localizar las mutaciones cercanas, esta resultó poco informativa debido a la gran cantidad de cambios. Nuevamente con estos modelos notamos la necesidad de segregar las mutaciones.

Perspectivas

El hecho de haber seleccionado tres mutantes en las cuales la mayoría de los cambios son diferentes, amplía las posibilidades de estudio, ya que tenemos un mayor número de caminos por explorar. En este sentido, se plantea como perspectiva la generación de nuevos bancos de recombinación con el gene silvestre y de esta manera segregar la mayoría de los cambios innecesarios, para que posteriormente se puedan generar bancos remutagenizados en busca de la optimización catalítica, ya que lo más probable es que no esté desarrollada al máximo, lo que se infiere con el tiempo de complementación de la auxotrofía, al ser mucho más lento que el de la proteína silvestre. Lo que se sugiere es intentar obtener un ensamble de fragmentos de menor tamaño durante el DNA shuffling o emplear otra técnica de recombinación como el StEP, con el fin de evitar el paso de fragmentación y reensamble. Esta técnica se basa en una reacción de PCR durante la cual se mezclan los templados a recombinar, dando muy cortos periodos de extensión del gene, seguido de ciclos de desnaturalización y alineamiento, así los fragmentos parcialmente extendidos hibridizan al azar con diferentes templados, logrando la combinación de las mutaciones (Encell and Loeb, 1998).

Consideramos que en este trabajo se han presentado evidencias de haber obtenido mutantes capaces de complementar la auxotrofía de biotina ocasionada por la eliminación de gene *bioF* basándonos en la evidencia fenotípica, y que por lo tanto se ha llevado a cabo la migración catalítica. La única manera de afirmar que se ha logrado es mediante la determinación de la actividad *in vitro*, por lo que se considera necesario realizarla. Los parámetros cinéticos de la enzima silvestre ya han sido reportados previamente empleando dos metodologías. La primera de ellas mide la desaparición del enlace thioester entre el ácido pimélico y la coenzima A (Ploux and Marquet, 1996). La más reciente se basa en un ensayo acoplado en el que se cuantifica la producción de NADH (figura 23) (Webster *et al.*, 2000). Este último método es el que se considera emplear posteriormente para medir las actividades.

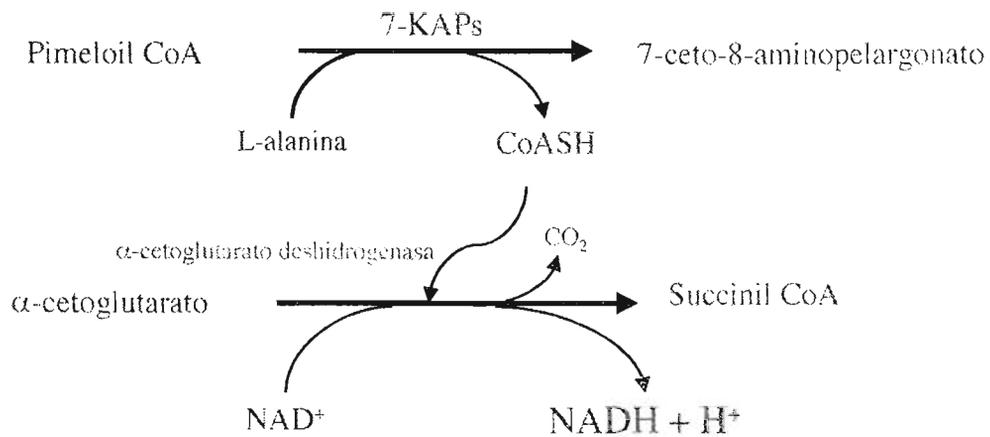


Fig. 23 Reacción acoplada que se empleará para medir la actividad *in vitro*.

Teniendo en mente la necesidad de medir la actividad de las mutantes, estas fueron clonadas en el vector de sobreexpresión pET28 junto con la enzima silvestre para poder purificarlas. En el caso de la proteína 7-KAPS, se purificó para comenzar el montaje del ensayo pero se presentaron problemas en la obtención de uno de los sustratos, ya que el Pimeloil CoA necesita ser sintetizado químicamente. Actualmente el grupo trabaja en la síntesis del compuesto *in vitro*, mediante el clonado y expresión del gene *bioW* de *Bacillus subtilis*.

Conclusiones

Las librerías mutagénicas a partir de las que se seleccionaron las mutantes capaces de complementar, se generaron mediante la técnica de PCR mutagénico, presentando una cantidad adecuada de variantes con un alta tasa de mutagénesis.

De acuerdo con evidencias fenotípicas se han identificado tres mutantes de carboxilesterasa capaces de complementar la auxotrofia de biotina de una cepa a la que se le eliminó el gene *bioF*, las cuales apoyan la hipótesis de que se ha logrado la migración catalítica de una función de carboxilesterasa hacia la de 7-KAPs .

La complementación presentada es conferida por las proteínas mutantes, ya que cuando el gene ha sido retransformado en varias ocasiones y en el caso de CAE16 subclonado, el fenotipo se conserva.

En este sistema de selección se requieren pequeñas cantidades de vitamina para activar la maquinaria metabólica, permitiendo así que las enzimas mutantes puedan desarrollar la nueva actividad. En este caso se comprobó que se requiere emplear una concentración de 10pM de biotina en el medio de cultivo para observar el fenotipo deseado.

Es necesaria la segregación de los cambios útiles de las variantes seleccionadas y la posterior exploración de nuevos cambios benéficos que puedan mejorar la eficiencia fenotípica que podría encontrarse directamente relacionada con la eficiencia catalítica, asimismo es necesario hacer la caracterización *in vitro* de las enzimas mutantes para corroborar de manera concluyente que se ha llevado a cabo la migración de la actividad enzimática.

Referencias

- Abecassis, V., Pompon, D., and Truan, G. (2000) High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombination in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Res* **28**: E88.
- Alexeev, D., Alexeeva, M., Baxter, R.L., Campopiano, D.J., Webster, S.P., and Sawyer, L. (1998) The crystal structure of 8-amino-7-oxononanoate synthase: a bacterial PLP-dependent, acyl-CoA-condensing enzyme. *J Mol Biol* **284**: 401-419.
- Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K., and Gershenson, A. (2001) How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem Sci* **26**: 100-106.
- Baldet, P., Gerbling, H., Axiotis, S., and Douce, R. (1993) Biotin biosynthesis in higher plant cells. Identification of intermediates. *Eur J Biochem* **217**: 479-485.
- Barker, D.F., and Campbell, A.M. (1980) Use of bio-lac fusion strains to study regulation of biotin biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **143**: 789-800.
- Barlow, M., and Hall, B.G. (2002) Predicting evolutionary potential: in vitro evolution accurately reproduces natural evolution of the tem beta-lactamase. *Genetics* **160**: 823-832.
- Cadwell, R.C., and Joyce, G.F. (1994) Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl* **3**: S136-140.
- Choi-Rhee, E., and Cronan, J.E. (2005) Biotin synthase is catalytic in vivo, but catalysis engenders destruction of the protein. *Chem Biol* **12**: 461-468.
- Christians, F.C., and Loeb, L.A. (1996) Novel human DNA alkyltransferases obtained by random substitution and genetic selection in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6124-6128.
- Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H., and Monticello, D.J. (2001) DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat Biotechnol* **19**: 354-359.
- Coco, W.M., Encell, L.P., Levinson, W.E., Crist, M.J., Loomis, A.K., Licato, L.L., Arensdorf, J.J., Sica, N., Pienkos, P.T., and Monticello, D.J. (2002) Growth factor engineering by degenerate homoduplex gene family recombination. *Nat Biotechnol* **20**: 1246-1250.
- Cohen, N., Abramov, S., Dror, Y., and Freeman, A. (2001) In vitro enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million. *Trends Biotechnol* **19**: 507-510.
- Copley, S.D. (2000) Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach. *Trends Biochem Sci* **25**: 261-265.
- Cramer, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., and Stemmer, W.P. (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* **391**: 288-291.
- Daugherty, P.S., Chen, G., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2000) Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2029-2034.
- Del Campillo-Campbell, A., Kayajanian, G., Campbell, A., and Adhya, S. (1967) Biotin-requiring mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **94**: 2065-2066.

- Drummond, D.A., Iverson, L.B., Georgiou, G., Arnold, H.F. (en prensa) Why High-error-rate Random Mutagenesis Libraries are Enriched in Functional and Improved Proteins. *J. Mol. Biol.*
- Dwyer, M.A., Looger, L.L., and Hellinga, H.W. (2004) Computational design of a biologically active enzyme. *Science* **304**: 1967-1971.
- Eckert, K.A., and Kunkel, T.A. (1990) High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **18**: 3739-3744.
- Eckert, K.A., and Kunkel, T.A. (1991) DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl* **1**: 17-24.
- Eisenberg, M.A., and Star, C. (1968) Synthesis of 7-oxo-8-aminopelargonic acid, a biotin vitamers, in cell-free extracts of *Escherichia coli* biotin auxotrophs. *J Bacteriol* **96**: 1291-1297.
- Eisenberg, M.A. (1987) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*: American Society for Microbiology.
- Encell, L.P., and Loeb, L.A. (1998) One small StEP in molecular evolution. *Nat Biotechnol* **16**: 234-235.
- Farber, G.K., and Petsko, G.A. (1990) The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem Sci* **15**: 228-234.
- Farinas, E.T., Bulter, T., and Arnold, F.H. (2001) Directed enzyme evolution. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 545-551.
- Fitch, W.M. (1970) Further improvements in the method of testing for evolutionary homology among proteins. *J Mol Biol* **49**: 1-14.
- Galperin, M.Y., Walker, D.R., and Koonin, E.V. (1998) Analogous enzymes: independent inventions in enzyme evolution. *Genome Res* **8**: 779-790.
- Gibbs, M.D., Nevalainen, K.M., and Bergquist, P.L. (2001) Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene* **271**: 13-20.
- Hiraga, K., and Arnold, F.H. (2003) General method for sequence-independent site-directed chimeragenesis. *J Mol Biol* **330**: 287-296.
- Jakoby, W.B., and Ziegler, D.M. (1990) The enzymes of detoxication. *J Biol Chem* **265**: 20715-20718.
- Jensen, R.A. (1976) Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu Rev Microbiol* **30**: 409-425.
- Joern, J.M., Meinhold, P., and Arnold, F.H. (2002) Analysis of shuffled gene libraries. *J Mol Biol* **316**: 643-656.
- Johnson, L.M., and Talbot, H.W., Jr. (1983) Detoxification of pesticides by microbial enzymes. *Experientia* **39**: 1236-1246.
- Joyce, G.F. (2004) Directed evolution of nucleic acid enzymes. *Annu Rev Biochem* **73**: 791-836.
- Jurgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M., and Sterner, R. (2000) Directed evolution of a (beta alpha)8-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9925-9930.
- Kack, H., Sandmark, J., Gibson, K., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1999) Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *J Mol Biol* **291**: 857-876.

- Kikuchi, M., Ohnishi, K., and Harayama, S. (1999) Novel family shuffling methods for the in vitro evolution of enzymes. *Gene* **236**: 159-167.
- Kikuchi, M., Ohnishi, K., and Harayama, S. (2000) An effective family shuffling method using single-stranded DNA. *Gene* **243**: 133-137.
- Kim, K.K., Song, H.K., Shin, D.H., Hwang, K.Y., Choe, S., Yoo, O.J., and Suh, S.W. (1997) Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an alpha/beta hydrolase with broad substrate specificity. *Structure* **5**: 1571-1584.
- Kimura, M. (1979) The neutral theory of molecular evolution. *Sci Am* **241**: 98-100, 102, 108 passim.
- Kimura, M. (1991) The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn J Genet* **66**: 367-386.
- Kitamura, K., Kinoshita, Y., Narasaki, S., Nemoto, N., Husimi, Y., and Nishigaki, K. (2002) Construction of block-shuffled libraries of DNA for evolutionary protein engineering: Y-ligation-based block shuffling. *Protein Eng* **15**: 843-853.
- Kolkman, J.A., and Stemmer, W.P. (2001) Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nat Biotechnol* **19**: 423-428.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Labrou, N.E. (2005) Directed enzyme evolution: Bridging the gap between natural enzymes and commercial applications. *Biomol Eng* **22**: vii-ix.
- Lee, S., Kang, H.Y., Lee, Y. (2003) High-throughput screening methods for selecting L-treonine aldolases with improved activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **26**: 265-272.
- Lorimer, I.A., and Pastan, I. (1995) Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNaseI in the presence of Mn²⁺. *Nucleic Acids Res* **23**: 3067-3068.
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L., Maranas, C.D., and Benkovic, S.J. (2001) Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11248-11253.
- Martinez, M.A., Pezo, V., Marliere, P., and Wain-Hobson, S. (1996) Exploring the functional robustness of an enzyme by in vitro evolution. *Embo J* **15**: 1203-1210.
- Matsumura, I., and Ellington, A.D. (2001) In vitro evolution of beta-glucuronidase into a beta-galactosidase proceeds through non-specific intermediates. *J Mol Biol* **305**: 331-339.
- Maynard, S.J. (1970) Natural selection and the concept of a protein space. *Nature* **225**: 563-564.
- Miyazaki, K., Wintrode, P.L., Grayling, R.A., Rubingh, D.N., and Arnold, F.H. (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J Mol Biol* **297**: 1015-1026.
- Miyazaki, K. (2002) Random DNA fragmentation with endonuclease V: application to DNA shuffling. *Nucleic Acids Res* **30**: e139.
- Moss, J., and Lane, M.D. (1971) The biotin-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **35**: 321-442.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S.,

- Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Venter, J.C., and Fraser, C.M. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**: 323-329.
- Ness, J.E., Welch, M., Giver, L., Bueno, M., Cherry, J.R., Borchert, T.V., Stemmer, W.P., and Minshull, J. (1999) DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. *Nat Biotechnol* **17**: 893-896.
- Ness, J.E., Kim, S., Gottman, A., Pak, R., Krebber, A., Borchert, T.V., Govindarajan, S., Mundorff, E.C., and Minshull, J. (2002) Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. *Nat Biotechnol* **20**: 1251-1255.
- O'Maille, P.E., Bakhtina, M., and Tsai, M.D. (2002) Structure-based combinatorial protein engineering (SCOPE). *J Mol Biol* **321**: 677-691.
- Oh, K.H., Nam, S.H., and Kim, H.S. (2002) Improvement of oxidative and thermostability of N-carbamyl-D-amino Acid amidohydrolase by directed evolution. *Protein Eng* **15**: 689-695.
- Orencia, M.C., Yoon, J.S., Ness, J.E., Stemmer, W.P., and Stevens, R.C. (2001) Predicting the emergence of antibiotic resistance by directed evolution and structural analysis. *Nat Struct Biol* **8**: 238-242.
- Otsuka, A.J., Buoncristiani, M.R., Howard, P.K., Flamm, J., Johnson, C., Yamamoto, R., Uchida, K., Cook, C., Ruppert, J., and Matsuzaki, J. (1988) The Escherichia coli biotin biosynthetic enzyme sequences predicted from the nucleotide sequence of the bio operon. *J Biol Chem* **263**: 19577-19585.
- Otten, L.G., and Quax, W.J. (2005) Directed evolution: selecting today's biocatalysts. *Biomol Eng* **22**: 1-9.
- Pai, C.H., and Lichstein, H.C. (1967) Biosynthesis of biotin in microorganisms. VI. Further evidence for desthiobiotin as a precursor in Escherichia coli. *J Bacteriol* **94**: 1930-1933.
- Peimbert, M., and Segovia, L. (2003) Evolutionary engineering of a beta-Lactamase activity on a D-Ala D-Ala transpeptidase fold. *Protein Eng* **16**: 27-35.
- Penning, T.M., and Jez, J.M. (2001) Enzyme redesign. *Chem Rev* **101**: 3027-3046.
- Pesaresi, A., Devescovi, G., Lamba, D., Venturi, V., and Degrossi, G. (2005) Isolation, characterization, and heterologous expression of a carboxylesterase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Curr Microbiol* **50**: 102-109.
- Ploux, O., and Marquet, A. (1996) Mechanistic studies on the 8-amino-7-oxopelargonate synthase, a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme involved in biotin biosynthesis. *Eur J Biochem* **236**: 301-308.
- Quemeneur, E., Moutiez, M., Charbonnier, J.B., and Menez, A. (1998) Engineering cyclophilin into a proline-specific endopeptidase. *Nature* **391**: 301-304.
- Reardon, D., and Farber, G.K. (1995) The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *Faseb J* **9**: 497-503.
- Sanishvili, R., Yakunin, A.F., Laskowski, R.A., Skarina, T., Evdokimova, E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G.A., Thornton, J.M., Arrowsmith, C.H., Savchenko, A., Joachimiak, A., and Edwards, A.M. (2003) Integrating structure, bioinformatics, and enzymology to discover function: BioH, a new carboxylesterase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 26039-26045.

- Schmidt-Dannert, C. (2001) Directed evolution of single proteins, metabolic pathways, and viruses. *Biochemistry* **40**: 13125-13136.
- Shao, Z., Zhao, H., Giver, L., and Arnold, F.H. (1998) Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res* **26**: 681-683.
- Sieber, V., Martinez, C.A., and Arnold, F.H. (2001) Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat Biotechnol* **19**: 456-460.
- Skandalis, A., Encell, L.P., and Loeb, L.A. (1997) Creating novel enzymes by applied molecular evolution. *Chem Biol* **4**: 889-898.
- Stemmer, W.P. (1994a) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10747-10751.
- Stemmer, W.P. (1994b) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
- Stemmer, W.P., Cramer, A., Ha, K.D., Brennan, T.M., and Heyneker, H.L. (1995) Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxynucleotides. *Gene* **164**: 49-53.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., and Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Strausberg, S.L., Alexander, P.A., Gallagher, D.T., Gilliland, G.L., Barnett, B.L., and Bryan, P.N. (1995) Directed evolution of a subtilisin with calcium-independent stability. *Biotechnology (N Y)* **13**: 669-673.
- Streit, W.R., and Entcheva, P. (2003) Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 21-31.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876-4882.
- Tsujita, T., and Okuda, H. (1993) Palmitoyl-coenzyme A hydrolyzing activity in rat kidney and its relationship to carboxylesterase. *J Lipid Res* **34**: 1773-1781.
- Warburg, O., Cristian, W. (1943) Isolierung und kristallization des garungsferments zymohexase. *Biochem. Z.* **314**: 149-176.
- Webster, S.P., Alexeev, D., Campopiano, D.J., Watt, R.M., Alexeeva, M., Sawyer, L., and Baxter, R.L. (2000) Mechanism of 8-amino-7-oxononanoate synthase: spectroscopic, kinetic, and crystallographic studies. *Biochemistry* **39**: 516-528.
- Williams, G.J., Nelson, A.S., and Berry, A. (2004) Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *Cell Mol Life Sci* **61**: 3034-3046.
- Zaccolo, M., and Gherardi, E. (1999) The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. *J Mol Biol* **285**: 775-783.

- Zha, D., Eipper, A., and Reetz, M.T. (2003) Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: a new tool in directed evolution. *ChemBiochem* **4**: 34-39.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A., and Arnold, F.H. (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat Biotechnol* **16**: 258-261.
- Zhao, H., Chockalingam, K., and Chen, Z. (2002) Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 104-110.
- Zuckerlandl, E., and Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* **8**: 357-366.

Apéndice

Tabla 1. Diferentes técnicas de recombinación, resumiendo sus ventajas y desventajas. Estos nuevos métodos se pueden dividir en seis categorías de acuerdo a la idea básica que plantean (Otten and Quax, 2005).

Recombinación	Técnica	Integrantes
Shuffling	Recombinación de pequeños fragmentos basándose en la homología. Requiere de una alta frecuencia de recombinación para poder separar mutaciones muy cercanas.	DNA Shuffling (Stemmer, 1994b) Family shuffling (Cramer <i>et al.</i> , 1998). RE cut Shuffling (Kikuchi <i>et al.</i> , 1999) ssDNA shuffling (Kikuchi <i>et al.</i> , 2000) Mn ²⁺ DNase cut (Lorimer and Pastan, 1995) Endonuclease V cut (Miyazaki, 2002) RPR (Shao <i>et al.</i> , 1998) RETT SCRATCHY (Lutz <i>et al.</i> , 2001)
Shuffling en la extensión total de los genes parentales	Recombinación de pequeños fragmentos de diferentes orígenes usando una o mas cadenas parentales completas. Alta frecuencia de recombinación pero es un técnica mas elaborada.	StEP (Zhao <i>et al.</i> , 1998) RACHITT (Coco <i>et al.</i> , 2001)
Entrecruzamiento simple	Recombinación de genes no homólogos, mediante la ligación de dos extremos diferentes de los genes, seleccionando un nuevo tamaño del gene. Hace posible la recombinación de genes con poca o nada de identidad pero solo hay un solo punto de recombinación.	ITCHY (Lutz <i>et al.</i> , 2001) SHIPREC (Sieber <i>et al.</i> , 2001) SCRATCHY (Lutz <i>et al.</i> , 2001)
Intercambio de dominios	Recombinación de partes estructurales, funcionales o de baja homología provenientes de diferentes familias. Se obtienen enzimas mas activas pero son pocos los puntos de recombinación, los cuales son difíciles de identificar.	Exon Shuffling (Kolkman and Stemmer, 2001) DOGS (Gibbs <i>et al.</i> , 2001) SISDC (Hiraga and Arnold, 2003) YLBS (Kitamura <i>et al.</i> , 2002) SCOPE (O'Maille <i>et al.</i> , 2002)
Recombinación <i>in vivo</i>	Recombinación usando el sistema de reparación de "gaps" en levadura o el sistema recE/recT de <i>E. coli</i> No se necesita un paso de ligación, pero se necesitan múltiples pasos y vectores especiales.	CLERY (Abecassis <i>et al.</i> , 2000) ET-recombination (Strausberg <i>et al.</i> , 1995)
Shuffling sintético	Recombinación de mutaciones en oligonucleótidos sintéticos. La recombinación de mutaciones cercanas es posible, pero es caro y se necesita una buena selección.	Single step shuffling (Stemmer <i>et al.</i> , 1995) DHR (Coco <i>et al.</i> , 2002) Synthetic Shuffling (Ness <i>et al.</i> , 2002) ADO (Zha <i>et al.</i> , 2003)

Protocolos

1.-Reacción en cadena de la polimerasa(PCR)

Para una reacción de 50 μ l:

- 5 μ l amortiguador (10X)
- 5 μ l mezcla de dNTPs 2.5mM(10X)
- 3 μ l oligo pKK3' 5 pM/ μ l
- 3 μ l oligo pKK5' 5 pM/ μ l
- 2 μ l MgCl₂ 50 mM
- 5 μ l Templado (pCAEO1) 50 ng/ μ l
- 1 μ l Taq polimerasa (Invitrogen) 2.5U/ μ l
- 5 μ l DMSO
- 21 μ l H₂O

Condiciones de la reacción:

30 ciclos de 3 pasos

- A. Desnaturalización 1 minuto 94°C
- B. Alineamiento de oligonucleótidos 1 minuto 55°C
- C. Extensión 2 minutos 72°C

2.- PCR mutagénica (Error-prone PCR).

Para una reacción de 100 μ l:

- 10 μ l amortiguador (10X)
- 10 μ l mezcla de dNTPs (10X): 2 mM dGTP, 2 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP
- 12 μ l oligo pKK3' 5 pM/ μ l
- 12 μ l oligo pKK5' 5 pM/ μ l
- 10 μ l MgCl₂ 50 mM
- 10 μ l MnCl₂ 5 mM
- 4 μ l Templado (pCAEO1) 50 ng/ μ l

-2 μ l Taq polimerasa (Invitrogen) 2.5U/ μ l

-10 μ l DMSO

-18 μ l H₂O

Condiciones de la reacción:

30 ciclos de 3 pasos

A. Desnaturalización 1 minuto 94°C

B. Alineamiento de oligonucleótidos 1 minuto 55°C

C. Extensión 2 minutos 72°C

2.-Purificación de bandas

Esta purificación se llevó a cabo con la finalidad de eliminar residuos de oligonucleótidos, nucleótidos, sales, polimerasa, etcétera. La purificación fue en agarosa al 1%, por el kit de QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit):

Se corta el fragmento de DNA del gel de agarosa.

Pesar el gel extraído, adicionando 3 volúmenes de amortiguador de solubilización QG por cada volumen de gel (100 mg \approx 100 μ l).

Incubación a 47°C por 10 minutos, mezclando el tubo constantemente para facilitar la disolución del gel.

Se transfiere a una columna de filtración, seguido de centrifugación durante 1 minuto a máxima velocidad. Descarta el contenido del tubo colector, adiciona 500 μ l de amortiguador de lavado QG y centrifugar 1 minuto.

Descarta el contenido del tubo colector, adicionar 750 μ l de amortiguador de lavado QG y centrifugar por 1 minuto. Se descarta el contenido del tubo colector y se centrifuga por 1 minuto adicional para descartar residuos de la solución de lavado.

La columna se transfiere a un tubo eppendorf, colocando 50 μ l de amortiguador de elución al centro de la columna, centrifuga por 1 minuto a máxima velocidad.

Lo colectado en el tubo eppendorf es el ADN purificado.

3.- Digestiones

Todas las reacciones de digestión analítica se realizaron en un volumen de 10 μ l, mientras que para las digestiones preparativas para purificación de banda el volumen de la reacción fue de 100 μ l.

Para 10 μ l:

-0.5 μ l de enzima *EcoRI* 10U/ μ l (Fermentas)

-0.5 μ l de enzima *HindIII* 10U/ μ l (Fermentas)

-1 μ l amortiguador 2 (10X, Biolabs)

-5 μ l DNA

-3 μ l H₂O

Condiciones de la digestión 15 minutos a 37°C

Para 100 μ l:

-4 μ l de enzima *EcoRI* 10u/ μ l (Fermentas)

-4 μ l de enzima *HindIII* 10u/ μ l (Fermentas)

-10 μ l amortiguador 2 (10X, Biolabs)

-82 μ l DNA

Condiciones de la digestión 12 horas a 37°C

Las digestiones se corrieron en geles de agarosa al 1.5%, teñidas en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5 μ g/ml.

4.- Purificación de fragmentos para ligación

Con la finalidad de eliminar los restos de las enzimas de restricción y los pequeños fragmentos cortados, se empleo el kit de Roche “High Pure PCR Product Purification Kit” el cual consiste en los siguientes pasos:

A 100 μ l de PCR se le adiciona 500 μ l de la solución 1 (amortiguador de unión).

Se transfiere a una columna de filtración y se centrifuga a 13,000 x g durante 30-60 seg.

Se descarta el líquido del tubo colector, adiciona 500 μ l de la solución 2 (amortiguador de lavado) y se centrifuga a 13,000 x g por 1 minuto.

Se descarta el líquido del tubo colector, adiciona 200 μ l de la solución 2 (amortiguador de lavado) y centrifuga a 13,000 x g por 1 minuto.

La columna se coloca en un tubo Eppendorf, adicionando al centro de la columna 50-100 μ l de solución 3 (Amortiguador de elusión) se centrifuga a 13,000 x g por 1 minuto.

Lo colectado en el tubo Eppendorf es el fragmento purificado.

5.- Ligaciones

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen de 20 μ l utilizando para ello 100ng de vector en todos los casos, 44 ng de inserto para el vector pKK223-3, 73ng en el caso de pUC18 y para pET28 se colocaron 36.6ng. Además se adicionaron 2 μ l de amortiguador (10X), 1 μ l de T4 ADN ligasa y completando el volumen con agua. La reacción se incubó a 16° C por espacio de 12 horas. Al producto de esta ligación se le adicionó 500 μ l de 1-butanol, se mezcló y centrifugó durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante procediendo al secado durante 10-15 minutos en el Savant. Después la pastilla fue resuspendida en 10 μ l de H₂O.

La concentración de inserto necesaria se calculó con base en una concentración fija de vector (100ng) utilizando la formula:

$$[(\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto Kb}) / \text{tamaño del vector Kb}] \times (\text{relación molar inserto} / \text{vector}).$$

6.- Preparación de células electrocompetentes.

La cepa de interés se creció en un matraz con 25 ml de LB líquido con antibióticos apropiados a 37°C por 12 horas con agitación constante. De este cultivo se tomaron 5 ml y se inoculó un matraz de un litro de LB líquido sin antibióticos, incubándolo a 37° C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.9 a 600 nm. A partir de este punto, todo el proceso se llevó a cabo en frío y en condiciones de esterilidad. El cultivo fue centrifugado a 5000 r.p.m. durante 15 minutos.

Las células fueron lavadas con 500ml de glicerol al 10%, se centrifugaron nuevamente como en el paso anterior, se resuspendieron en 250ml de agua y se volvieron a centrifugar. Ahora las células fueron resuspendidas en 125 ml de glicerol al 10% para finalmente centrifugarse y resuspenderse en 3 ml de medio GYT. Posteriormente se hicieron alícuotas de 50 μ l que se mantuvieron a -70°C (Schmindt-Dannert, 2001).

7.- Electroporación

Las células electrocompetentes fueron descongeladas lentamente manteniéndolas en hielo. A los 50 μ l de células se les añadió de 1-2 μ l del plásmido (50-100 ng/ μ l). Esta mezcla se transfirió en una celda para electroporar (0.1 cm, BIORAD) previamente enfriada. La celda se colocó en la cámara de seguridad del electroporador el cual fue programado para generar pulsos con una descarga de 1.8 Kv/cm con una resistencia de 200 Ω y una capacitancia de 25 μ FD.

Inmediatamente después del pulso las células fueron transferidas de la celda a un tubo de ensaye que contenía 980 μ l de medio SOC, 10 μ l de MgCl₂ 10mM y 10 μ l de glucosa al 20%, en el cual se dejaron recuperar durante 1 hora a 37°C con agitación.

8.- Preparación y transformación de células competentes en CaCl₂

Para prepararlas se hizo un precultivo de la cepa de interés en 5ml de LB. A partir de este se inoculo 1:100 un volumen mayor, es decir, 500ml de LB liquido. Se dejó crecer el cultivo hasta alcanzar una densidad óptica de 0.9 a 600nm. Después se centrifugaron en frío durante 15 minutos a 5000 r.p.m. Una vez descartado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 5 ml de CaCl₂ 1 M y se hicieron alícuotas de 50 μ l que se mantuvieron a -70°C.

En el caso de la transformación se tomó una de las alícuotas añadiendo 5 μ l de plásmido, se mezclaron y dejaron reposar en hielo durante 30 minutos. Pasado este tiempo se les dio un choque térmico a 42°C durante 90 segundos, después se pusieron en hielo

durante 2 minutos y se les añadió 1ml de medio SOC, antes de plaquear se recuperaron durante una hora incubando a 37°C.

9.- Lavado de células

El medio rico líquido proveniente de la electroporación y de los cultivos de 12 horas, fue centrifugado durante dos minutos a 5,000 r.p.m., se decantó el sobrenadante resuspendiendo las células en medio mínimo líquido carente de biotina y antibióticos. Repitiendo este proceso en 3 ocasiones, conservando siempre las condiciones de esterilidad.

10.- Extracción de plásmido

La extracción de plásmido se realizó mediante el kit de Roche (High Pure Plasmid Isolation Kit).

Un cultivo de tres mililitros se centrifuga a 9000 r.p.m. durante 30 segundos, se descarta el sobrenadante y resuspende la pastilla en 250 μ l de solución 1(amortiguador de suspensión con RNAsa).

Se adicionan 250 μ l de solución 2 (amortiguador de lisis), mezclando cuidadosamente e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se adicionan 350 μ l de solución 3 (amortiguador de unión en frío), mezclando cuidadosamente e incubando durante 5 minutos en hielo.

Se centrifuga durante 10 minutos a máxima velocidad, el sobrenadante es recuperado transfiriéndolo entonces a una columna de filtración, volviendo a centrifugar a máxima velocidad durante 30-60 segundos.

Descartando el líquido contenido en el tubo colector y adicionando a la columna 500 μ l de la solución 4 (amortiguador de lavado I), centrifuga a 13,000 x g por 1 min.

Nuevamente descartando el líquido contenido en el tubo colector y adicionando a la columna 700 μ l de la solución 5 (amortiguador de lavado II), se centrifuga a 13,000 x g por 1 min. Se centrifuga un minuto adicional , después transfiere la columna a un tubo

ependorf, se añaden 100 μ l de solución 6 (amortiguador de elusión) y se centrifuga por 1 minuto a 13,000 x g. Lo colectado en el tubo ependorf es el plásmido purificado.

11.- Reacción de la recombinación *in vitro* por DNA shuffling

Primero se realizaron pruebas con DNAsal para identificar la concentración y el tiempo necesarios para generar fragmentos del tamaño que nos interesa recombinar. Una vez determinado, se digirió 50 μ l del PCR producto de la mezcla de variantes con 1U de DNAsal durante 35 minutos. Se corrieron en un gel de agarosa al 1%, cortando del mismo una banda que contenía los fragmentos de 100 a 200 pb. Esta banda fue purificada por el proceso explicado anteriormente (ver purificación de bandas). Los fragmentos se ensamblaron haciendo una amplificación por PCR omitiendo los oligos.

Cada reacción contenía:

- 5 μ l amortiguador (10X)
- 5 μ l mezcla de dNTPs 2.5mM(10X)
- 2 μ l MgCl₂ 50 mM
- 15 μ l Templado
- 1 μ l Taq polimerasa (Invitrogen) 2.5U/ μ l
- 5 μ l DMSO
- 21 μ l H₂O

30 ciclos de 3 pasos

- A. Desnaturalización 1 minuto 94°C
- B. Alineamiento de oligonucleótidos 1 minuto 55°C
- C. Extensión 2 minutos 72°C

El producto de la reacción anterior se empleó como templado para una nueva amplificación por PCR con oligos en las condiciones detalladas en la sección 1, poniendo 2 μ l de templado y ajustando el volumen con H₂O. El producto final fue purificado y digerido para ser clonado en el vector pKK223-3.

12.- Purificación de proteína por columna de afinidad.

A partir de un precultivo crecido en LB durante 12 horas, se inoculó 5 ml en 500ml de medio mínimo líquido, es decir, en una proporción 1 a 100. Se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm, entonces se indujo con 0.5 mM de IPTG. Después, las células del cultivo fueron recuperadas centrifugándolas durante 20 minutos a 5000 r.p.m. Se desechó el sobrenadante, las células se resuspendieron en buffer A (Fosfato 50mM y NaCl₂ 300mM pH 7.63). Se sonicaron 15 ciclos de 30 segundos. Se centrifugo por 25 minutos a 10000 r.p.m. Posteriormente se filtro a través de una membrana de .02 μ para remover agregados proteicos. La purificación se realizo por afinidad en una columna de níquel usando un Akta FPLC. Las fracciones colectadas fueron dializadas en buffer 50mM de fosfato, NaCl₂ 20 mM, 1mM EDTA, 0.1mM DTT, pH 7.8 a 4°C durante toda la noche con la finalidad de remover el imidazol del buffer de elusión de la columna.

13.- Cuantificación de proteína total por Bradford.

Para determinar la concentración de proteínas totales contenidas en una solución se empleó la técnica de Bradford usando el reactivo comercial de BIO-RAD*.

Se realizó una curva patrón con cantidades conocidas de proteína leyendo en un espectrofotómetro a 595nm las siguientes muestras:

Proteína (tg)	Solución estándar 1mg/ ml de BSA	Amortiguador experimental (μ l)	Bradford* (μ l)
0	0	800	200
2.5	2.5	797.5	200
5	5	795	200
10	10	790	200
15	15	785	200
20	20	780	200

Para leer las muestras problema

Muestra (μ l)	Amortiguador experimental (μ l)	Bradford* (μ l)
20	780	200
50	750	200

Medios de cultivo

SOC

- 20 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 ml NaCl 1M
- 2.5 ml KCl 1M
- Complementar con agua a 1 l

LB sólido

- 10 g triptona
- 10 g NaCl
- 5 g extracto de levadura
- 15 g bacto agar
- 1 ml estreptomicina 200mg/ml(1000X)
- 1 ml kanamicina 25mg/ml (1000X)
- 1 ml ampicilina 200mg/ml (1000X)
- complementar con agua miliQu a 1 l

Medio GYT

- 10 ml de glicerol
- 125 mg de extracto de levadura
- 250 mg de triptona
- Complementar con agua miliQu a 100 ml

Medio Mínimo M9 sólido

- 500 ml agar
- 500 μ l MgSO₄
- 100 ml sales M9-5 ml glucosa 20%
- 2.5 ml casaminoacidos
- 500 μ l estreptomicina 200mg/ ml(1000X)
- 500 μ l kanamicina 25mg/ml (1000X)
- 500 μ l ampicilina 200mg/ml (1000X)
- (opcional) 500 μ l biotina 10mM

Medio Mínimo M9 líquido (para lavado)

- 50 ml H₂O
- 10ml sales M9
- 50 μ l MgSO₄
- 500 μ l glucosa 20%
- 250 μ l casaminoácidos

