



**Translocación del asa-6 de la subunidad alfa de  
Triptofano Sintetasa en el asa-6 de PRAI (Fosforribosil  
Antranilato Isomerasa)**

**Tutora: Dra. Gloria Saab Rincón**

**Azucena Carrillo Hernández**

**Abril 2008**



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.

*A mi mamá, a mi papá y mi hermano:  
Gracias por ser mi familia y mi vida*

*Los amo*

Esta tesis de licenciatura fue realizada gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, en el marco de los proyectos 37023-N y IN214803, respectivamente.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Dra. Gloria Saab Rincón, directora de esta tesis

Al Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero

A mis sinodales: Dr. Luis José Delaye Arredondo, Dr. Lorenzo P. Segovia Forcella, Dr. Víctor Manuel Valdés López, al M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera, al Dr. Ramón Peralta y Fabi por firmar los votos aprobatorios en ausencia del Dr. L. J. Delaye A.

Al Biólogo Filiberto Sánchez López por su asistencia técnica

Al Dr. Joel Osuna Quintero y la Dra. Isabel Gómez Gómez

Al grupo del Dr. Juan Enrique Morett Sánchez y Adrián Ochoa Leyva

A la Sra. Juanita Ferrer Fuentes y al Sr. Francisco Reyes

Por su amistad: Diana Cepeda Andrade, Gabriel Contreras Ferrat, J. Yazmin Damián Almazo, Biviana Flores Escobar, Adrianita Luna Díaz, Gabriela Espinosa Molina, Francisco Gasteazoro Piñero, Carlos Orvañanos Rea, Loyi Rea Burguette, Lorena Sánchez Sánchez, Karina Verdel Aranda, Maricruz, Consuelito Vázquez Limón y Joelito Vega Badillo.

A Nelly Mellado por su asistencia contable y administrativa.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología, UNAM: Dr. Paul Gaytán Colín, Quim. Jorge Yañez Ponce de León, M en C María Soledad Juárez Ramírez, Q. I. Santiago Becerra Ramírez y M en C Eugenio López Bustos.

## ÍNDICE

<b>GLOSARIO</b> .....	3
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	8
1. BARRILES( $\beta\alpha$ ) <sub>8</sub> .....	10
1.1 Características.....	10
1.2 Evolución del Plegamiento de barril TIM.....	15
1.3 Fosforribosil Antranilato Isomerasa (PRAI).....	24
1.4 Triptofano Sintetasa.....	31
2. EL PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS y SU IMPORTANCIA.....	35
3. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS & EVOLUCIÓN DIRIGIDA.....	41
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	47
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	47
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	48
1. OLIGONUCLEÓTIDOS y CONSTRUCCIÓN DEL GEN MUTANTE DE PRAI. PREPARACIÓN de la LIBRERÍA.....	48
2. VECTOR pDAN5-PRAI.....	54
3. VECTOR pDAN5-PRAICAT.....	57
4. SUBCLONACIÓN DEL BANCO DEL ASA 6 DE TrpS EN EL VECTOR pDAN5PRAICAT.....	58
5. INDUCCIÓN y SOBREEXPRESIÓN de PROTEÍNA.....	61
6. SDS-PAGE. ANÁLISIS de SOLUBILIDAD de PROTEÍNA.....	61
7. CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES.....	62
8. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO.....	62
9. SECUENCIACIÓN.....	62
10. COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA DE CEPAS AUXÓTROFAS.....	63
<b>RESULTADOS y DISCUSIÓN</b> .....	65
1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	65
2. BANCO DE MUTANTES DEL ASA 6 DE LA SUBUNIDAD ALFA DE TRIPTOFANO SINTETASA.....	68
3. COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA DE CEPAS AUXÓTROFAS USANDO EL BANCO CONSTRUIDO.....	77
Cepa Auxótrofa JM101 <trpf>::cicatriz<math>\Delta</math>PRAI.....</trpf>	77
Cepa Auxótrofa JM101::cicatriz $\Delta$ thiE.....	80
Cepa Auxótrofa JM101:VR101: $\Delta$ TIM.....	83
Cepa Auxótrofa JM101::cicatriz $\Delta$ hisA.....	84
4. CAT COMO REPORTERO de PLEGAMIENTO. ANÁLISIS de SOLUBILIDAD del BANCO del ASA 6 de PRAI con SDS-PAGE.....	85

<i>CONCLUSIONES</i> .....	90
<i>PERSPECTIVAS</i> .....	91
<i>APÉNDICE</i> .....	92
<i>REFERENCIAS</i> .....	95

## GLOSARIO

**ADN** Ácido Desoxirribonucleico

**CAT** Cloranfenicol Acetil Transferasa

**CdRP** 1-(o-carboxifenilamino)-I-deoxirribulosa 5-fosfato

**DHFR** Dihidrofolato Reductasa

**DHFR** Dihidrofolato Reductasa

**FAD** Flavín Adenin Dinucleótido

**GFP** Proteína Verde Fluorescente

**IGPS** Indol Glicerol Fosfato

**NAD** Nicotinamida Adenin Dinucleótido

**NADH+** Nicotinamida Adenin Dinucleótido (Forma Reducida)

**OD** Densidad Óptica

**ORF** Marco Abierto de Lectura

**PCR** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PDB** Banco de Datos de Proteína

**PLP** Piridoxal Fosfato

**PRA** Fosforribosil Antranilato

**PRAI** Fosforribosil Antranilato Isomerasa

**PRFAR** N'-[(5'-fosforribulosil)-formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleótido

**ProFAR** N'-[(5'-fosforribosil)-formimino]-5 aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleótido

**RFP** Proteína Roja Fluorescente

**RNA** Ácido Ribonucleico

**SCOP** Structural Classification of Proteins. Clasificación Estructural de Proteínas

**SDS** Dodecil Sulfato de Sodio

**SDS-PAGE** Electroforesis desnaturalizante en Acrilamida para proteínas

**TIM** Triosa Fosfato Isomerasa

**TRPA** subunidad alfa de Triptofano Sintetasa

**TrpF** N-(5'-fosforribosil)-antranilato Isomerasa

**trpF** Gene que codifica para la proteína PRAI

**TrpS** Triptofano Sintetasa



## RESUMEN

Los avances en ingeniería de proteínas y evolución dirigida han contribuido a la comprensión de la estructura y la función de las proteínas. También, la disponibilidad de acceso y la continua expansión de las bases de datos son dos hechos que contribuyen al fortalecimiento de la información depositada, de tal manera que un enfoque actual en la ingeniería de proteínas es aplicar el diseño racional usando un plegamiento estable y una estrategia de evolución dirigida para buscar la producción de enzimas *de novo* adaptables a sustratos específicos.

Los estudios fijan la atención en las teorías evolutivas de divergencia y convergencia para explicar la diversidad natural de los plegamientos y sus funciones catalíticas; aunque muchos genomas se han secuenciado y se han elaborado herramientas bioinformáticas que facilitan el análisis de éstos, hasta el momento no se han resuelto la función y estructura de cada una de las proteínas que los conforman. El interés general se concentra en comprender los efectos que causan las mutaciones sobre la secuencia de ADN del gen, y cómo éstas repercuten en la estructura y función de las proteínas. Los experimentos de C.B. Anfinsen en 1971 marcan una etapa importante dentro de la historia de la biología molecular, porque con base en sus estudios, se determina que la secuencia determina la estructura tridimensional de la cadena polipeptídica. Finalmente, la relación que guarda la estructura y la función de una proteína es definida desde el momento en que se establece que un tipo de plegamiento, como el del barril TIM, puede desempeñar diferentes funciones, por lo que hoy en día, se afirma que el tipo de plegamiento no es una condición determinante para que una proteína conduzca un sólo tipo de catálisis enzimática; cabe resaltar que la exploración de paisajes evolutivos para las secuencias nucleotídicas y los plegamientos proteicos y sus funciones contribuye a la expansión del acervo, el cual es necesario para el desarrollo de nuevas teorías que se adapten a las tendencias actuales en la ingeniería de proteínas que parten de la idea de mantener una estructura proteica tridimensional, sin grandes afectaciones, pero que reinventen funciones catalíticas adaptables a un contexto biológico.

En este trabajo, con la complementación genética de las cepas auxótrofas usando la librería de mutantes de PRAI no se reconoció ninguna variante capaz de complementar alguna de las funciones para las que existen métodos de selección en el

laboratorio. Este fue un resultado esperado, ya que la translocación del asa 6 de la subunidad  $\alpha$  de triptofano sintetasa en el asa 6 de PRAI no avalaba un cambio en la actividad catalítica, porque los resultados, producto de múltiples ensayos hechos con miembros de esta familia, revelan que para llevar a cabo la catálisis, en el andamiaje de los barriles- $(\beta\alpha)_8$ , intervienen dos características estructurales propias de esta familia: i) los residuos catalíticos se localizan en la base de las asas o en las asas mismas, razón por la cual se diseñó la inserción de variabilidad en los codones 124 y 126 de la hebra  $\beta$ -5 y ii) en la catálisis intervienen, generalmente, más de una asa, por lo tanto, no podía esperarse un cambio de función haciendo únicamente la translocación del asa 6 de la subunidad  $\alpha$  de triptofano sintetasa en el asa 6 de PRAI; sin embargo, este trabajo es sólo una parte del proyecto con miras a recombinar todas las secuencias intercambiadas en las asas de PRAI.

Este trabajo es parte de un proyecto en el que posteriormente se recombinarán diferentes asas para buscar nuevas actividades catalíticas, usando los sistemas de selección y tamizaje disponibles en el laboratorio o buscando nuevos sistemas que se adapten al diseño.

El presente trabajo hace énfasis en tres objetivos: i) la búsqueda de nuevas funciones catalíticas usando el andamiaje de PRAI y translocando el asa catalítica de una enzima que pertenece a la misma familia estructural, y por la mutación sitio-dirigida de dos residuos localizados en el extremo carboxilo terminal de la hebra- $\beta$ 6 de PRAI —V124 y D126 catalíticos—, ii) la estabilidad de plegamiento del banco de mutantes del asa 6 de PRAI fusionado al reportero de plegamiento CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa) y iii) probar esta estrategia experimental para introducir variabilidad en regiones específicas de la secuencia del gene que codifica para la proteína PRAI de *E. coli*. Porque se propone que en una edad temprana de la evolución las proteínas adquirieron las funciones catalíticas actuales por eventos de recombinación, inserción y delección de pequeños fragmentos de secuencia, se piensa que para buscar mayor diversidad catalítica en las enzimas, estos eventos pueden reproducirse en el laboratorio a una menor escala de tiempo y usando un andamiaje proteico modelo estable que aun cuando a su secuencia de ADN se le someta a numerosas rondas mutagénicas, su estructura tridimensional permanezca. Es fundamental analizar la estabilidad de plegamiento y solubilidad de las quimeras de PRAI para indagar en las propiedades de

este andamiaje y tratar de establecer reglas que definan las mutaciones permitidas en la secuencia que codifica para esta proteína.

La fusión de la librería de mutantes de PRAI fue analizada desde dos perspectivas; la primera, en un SDS-PAGE (electroforesis desnaturizante de proteínas que utiliza un gel de Poliacrilamida y Dodecil Sulfato de Sodio —SDS— como agente iónico que rompe enlaces no covalentes en las proteínas, y provoca la desnaturización y la pérdida de su conformación nativa) se analiza y observa la expresión de las proteínas en las fracciones soluble e insoluble de las quimeras seleccionadas y, segunda, por un Western Blot se corrobora la existencia de la fusión de la proteína CAT.

## INTRODUCCIÓN

Para entender cómo evolucionan las proteínas dentro del contexto experimental es preciso establecer las bases moleculares de su adaptación, y con base en la información generada se ha concebido la generación de proteínas *de novo* haciendo uso del diseño racional y de técnicas de biología molecular. Otro rubro que ha causado gran interés es la oportunidad de inferir la filogenia para los múltiples plegamientos que han sido definidos recientemente (Jordan, et al., 2005).

Las enzimas (aproximadamente 40% de los marcos de lectura abiertos, ORFs) identificadas gracias a los proyectos de secuenciación de genomas han sido clasificadas con el criterio de homología tomando como referencia las que han sido asentadas en las bases de datos (Entrez, SwissProt, TrEMBL). Cuando se trata de asignar una función a un ORF desconocido se recurre a la comparación de secuencias de ORFs cuya función ha sido descrita y para clasificar las enzimas funcionales se aplican criterios como la comparación de un ORF desconocido contra uno de la base de datos.

Las enzimas pueden ser clasificadas en familias (50% de identidad de secuencia) y superfamilias (<50% de identidad de secuencia) (Gerlt, J. & Babbit, P. 1998). Se espera que los miembros de una familia catalicen el mismo tipo de reacción química sobre sustratos con estructura química similar, mientras que los miembros de una superfamilia no catalizan el mismo tipo de reacción aún cuando la estructura de sus sitios activos sean semejantes (Thornton, J., *et al.*, 1999). La comparación de estructuras para identificar relaciones evolutivas entre proteínas es una herramienta complementaria para la ingeniería de proteínas, destinada principalmente al análisis detallado de la estructura de sitios activos y sitios de interacción con ligandos. (Gerlt, J. & Babbit, P., 2000., Orengo, C. et al. 1999)

Con excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalítico, todas las enzimas son proteínas y en su mayoría, catalizan reacciones químicas sobre sustratos específicos, no obstante, existen enzimas promiscuas que tienen afinidad

por sustratos alternos pero químicamente similares (O'Brien, P.J. and Herschlag, D. 1999). Las enzimas participan en el metabolismo celular para sintetizar y degradar las biomoléculas necesarias en procesos como crecimiento, reparación, proliferación, duplicación y muerte celular, entre otros (Bartlett, G.J., *et al.* 2002). Su peso molecular oscila entre 12 kD y 10,000 kD. La actividad catalítica de una enzima depende de su conformación nativa y de los aminoácidos catalíticos, algunas necesitan de iones metálicos como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ ; y otras requieren de cofactores orgánicos o coenzimas como  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}^+$ , FAD, Coenzima A, fosfato de piridoxal y pirofosfato de tiamina

Las enzimas son los mejores catalizadores porque pueden superar la eficiencia de catálisis hasta en 17 órdenes de magnitud comparada con la velocidad de reacción para un sustrato definido en ausencia de catálisis (Chica, R., *et al.*, 2005), por lo que la industria ha mostrado peculiar interés en estas biomoléculas. A partir de la década de los 90's, con la explosión de los proyectos de secuenciación genómica y el incremento en el número de estructuras de proteínas resueltas disponibles en las bases de datos, se ha dedicado esfuerzo al entendimiento de los mecanismos catalíticos, su relación con las características estructurales y a la formulación de hipótesis evolutivas. Una de las finalidades de generar todo este conocimiento es integrarlo y aplicarlo en diversos ámbitos como la industria química, la medicina, la biorremediación, la industria alimentaria, la industria farmacéutica y la ingeniería de proteínas.

La ingeniería de proteínas se ha visto favorecida con la creciente información de secuencias y de estructura de proteínas, ya que permite hacer un diseño más racional en aras de modificar la actividad catalítica de una enzima a través del alineamiento de secuencias y aunado a un alineamiento estructural que pueden ayudar a determinar la homología<sup>1</sup> de las proteínas analizadas. Es decir, el alineamiento de la estructura de alguna proteína homóloga que conserve un grado

---

<sup>1</sup> La homología es el resultado de la evolución divergente: un gene progenitor es duplicado y su copia puede evolucionar para asumir una nueva función como respuesta a la presión selectiva. Las proteínas homólogas tienen un ancestro común y su estructura las relaciona entre sí (Gerlt, J. and Babbitt, P., 2000).

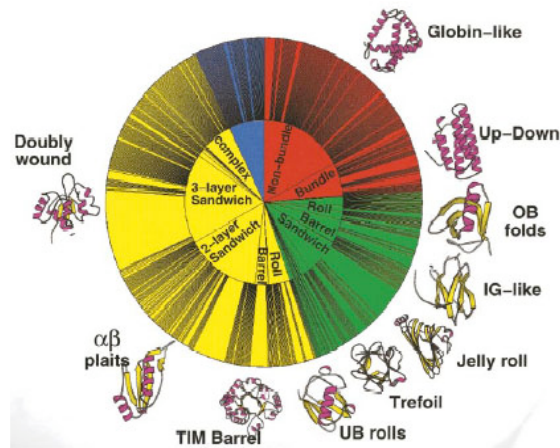
de identidad alto con la proteína que se desea modificar, permite a través de un alineamiento de secuencias identificar los residuos del sitio catalítico y, de esta manera facilitar la tarea de diseñar las mutaciones teóricamente efectivas para transformar la enzima. En general, se sabe que las mutaciones dentro o contiguas al sitio activo y aquellas en los residuos implicados en la unión del ligando pueden provocar cambios positivos o negativos en las propiedades enzimáticas como la enantioselectividad y la especificidad por sustratos, mientras que propiedades como la estabilidad de plegamiento se encuentran propagadas más ampliamente a lo largo de toda la proteína. Para generar mutaciones puntuales al azar dentro de una zona restringida o bien, al azar en todo el espacio de secuencia, se han desarrollado metodologías como la mutagénesis a saturación y mutagénesis al azar, que combinadas con la recombinación puede elevar la probabilidad de modificar la actividad catalítica de una enzima puesto que la exploración del espacio de secuencia es mayor (Chica, R., et al. 2005, Arnold, F.H., 2006).

## 1. BARRILES ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>

### CARACTERÍSTICAS

Las enzimas clasificadas en la topología de barril ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> han generado gran interés en el campo de la ingeniería de proteínas ya que es una arquitectura predominante en enzimas del metabolismo central cuya estructura se conoce (Tabla 1). Enzimas con este plegamiento catalizan cinco de las seis reacciones químicas reportadas por la Comisión de Enzimas (Enzyme Commission, E.C.): Oxidoreductasas (E.C. 1), Transferasas (E.C. 2), Hidrolasas (E.C. 3), Liasas (E.C. 4) e Isomerasas (E.C. 5) con excepción de la reacción de Ligasa (E.C. 6); y su arquitectura parece ideal para diseñar enzimas con nuevas funciones catalíticas, hecho que reporta la literatura, donde específicamente se hace énfasis en la posibilidad de intercambiar actividades catalíticas sin comprometer la estabilidad del andamiaje (Sternier & Höcker, 2005; Petsko, 2000., Höcker, 2005). El conocimiento y entendimiento de las propiedades de los sitios activos, de los mecanismos catalíticos y de las rutas de plegamiento de las proteínas, son parámetros ineludibles para el diseño *de novo*

de estas biomoléculas, así como para la predicción de funciones a partir de la estructura y mejoramiento de la actividad catalítica. Asimismo, por las características mencionadas arriba se han contemplado como modelos a diversos miembros de la familia de los barriles- $(\beta\alpha)_8$ , tal es el caso de: PRAI, IGPS, TrpSa, HisA, HisF, TIM, algunas aldolasas, entre otros; cabe resaltar que existen casos documentados que respaldan la total aceptación de este plegamiento con la finalidad de intercambiar funciones catalíticas asociadas con un protocolo de selección, caracterización o resolución cristalográfica de las variantes diseñadas (Jürgens, C., *et al.* 2006., 2003., Gerlt, J. & Babbitt, P., 2001., Jürgens, *et al.*, 2000)



**Figura 1.** El universo de estructura de proteínas en el PDB (Protein Data Bank, 1997) ilustrado por CATH (CATH es una clasificación jerárquica de las estructuras de los dominios proteicos, los cuáles se agrupan en cuatro niveles: Clase (C), Arquitectura (A), Topología (T) y superfamilia por Homología (H)), muestra la población de familias homólogas en diferentes grupos de plegamiento, arquitecturas y clases. Cada una de las secciones coloreadas representa una clase (en rojo, principalmente  $\alpha$ ; en verde principalmente  $\beta$ ; en amarillo,  $\alpha/\beta$ ; en azul, estructuras secundarias con un porcentaje minoritario). Fuera del círculo se señalan las diferentes familias que comprenden cada tipo de plegamiento. Tomado de Thornton, J., *et al.* 1999.

	<b>Proteína</b>	<b>Familia SCOP</b>	<b>Ruta</b>	<b>Tipo de Reacción Catalizada</b>	<b>PDB</b>
<i>lctD</i>	Lactato deshidrogenasa	FMN-linkes transferasa	Respiración	E.C. 1.1.2. Oxidoreductasas. Catalizan reacciones Redox . Utilizan un citocromo como aceptor de electrones	1ltd
<i>pyk</i>	Piruvato quinasa	Fosfoenolpiruvato/ piruvato	Glicólisis	E.C. 2.7.1. Fosfotransferasas, el aceptor de electrones es un grupo alcohol.	1*3w
<i>ppsA</i>	Fosfoenolpiruvato sintetasa	Fosfoenolpiruvato/ piruvato	Conversiones a Piruvato	E.C. 2.7.9. Fosfotransferasas.	1dik
<i>hisA</i>	P-Ribosilformimino-AICAR-P-isomerasa	-	Histidina	E.C. 3.1.3. Hidrolasas. Enzimas que actúan sobre enlaces éster.	1qo2
<i>ppc</i>	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	Fosfoenolpiruvato/ piruvato	Conversiones a piruvato	E.C. 4.1.1. Enzimas que catalizan la descarboxilación de aminoácidos, beta-ceto ácidos y alfa-ceto ácidos.	1fiy
<i>trpC_2</i>	Indol 3-glicerol-P sintetasa	Unión ribulosa fosfato	Triptofano		1a53
<i>fbal(I)</i>	Fructuosa-1,6-bifosfato Aldolasa (Base de Schiff)	Aldolasa	Glicólisis	E.C. 4.1.2. Enzimas que catalizan la ruptura de enlaces C-C dentro de una molécula que tiene un grupo hidroxilo y un grupo carbonilo para formar un aldehído o una cetona.	1fba
<i>fbal(II)</i>	Fructuosa-1,6-bifosfato Aldolasa (Metal dep)	Aldolasa	Glicólisis		1b57
<i>eda</i>	KDGP Aldolasa	-	Entner-Doudoroff		1kga
<i>aroG</i>	2-Dehydro-3-deoxifosfoheptanoato Aldolasa	Aldolasa	Corismato		1qr7
<i>aroD</i>	3-Dehydroquinasa	-	Corismato	E.C. 4.2.1. Enzimas que catalizan la remoción de agua de un sustrato por la ruptura de un enlace C-O, el resultado es la formación de un doble enlace.	1qfe
<i>eno</i>	Enolasa	Enolase dominio-C-terminal	Glucólisis		1one
<i>trpA</i>	Triptofano sintetasa subunidad- $\alpha$	Unión ribulosa fosfato	Triptofano		1ttq
<i>dapA</i>	Dihidrodipicolinato sintetasa	Aldolasa	Lisina (ácido $\alpha$ -aminoadipico)		1dhp
<i>rpe</i>	D-ribulosa-5-P 3-fosfato epimerasa	Unión a ribulosa fosfato	Pentosas	E.C. 5.1.3.1 Enzimas que catalizan reacciones de isomerización usando carbohidratos y derivados como sustratos	1rpx
<i>tpi</i>	Triosa fosfato isomerasa	TIM	Glicólisis	E.C. 5.3.1 Enzimas que facilitan la interconversión de isómeros. (Aldosas y Cetosas)	1tph
<i>trpC_1</i>	Fosforribosil antranilato isomerasa	Unión ribulosa fosfato	Triptofano		1nsj
<i>hisF</i>	Imidazolglicerolfosfato sintetasa	-	Histidina	-	1thf
<i>thiE</i>	Tiamina fosfato sintetasa	Tiamina fosfato sintetasa	Síntesis de Tiamina	-	2pps

**Tabla 1.** Proteínas con plegamiento barril-TIM. (Modificado de Copley, R. & Bork, P., 2000)

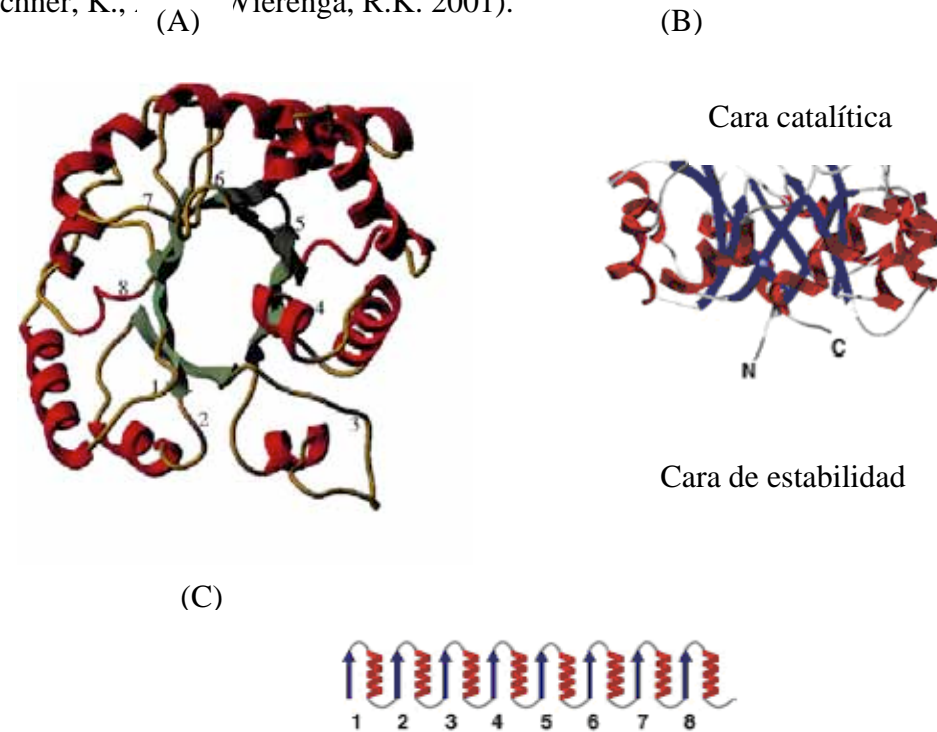


El PDB reporta que el plegamiento de barril- $(\beta\alpha)_8$  es el más recurrente entre las enzimas (Fig. 1), ya que el 10% corresponde a la arquitectura del barril TIM (Sternier & Höcker, 2005). El nombre de barril TIM fue adoptado desde el momento en que la primera proteína resuelta con este plegamiento fue la enzima Triosa Fosfato Isomerasa (Triose Phosphate Isomerase, por sus siglas en inglés), en el año de 1975 por Banner y colaboradores (Banner, D.W., *et al.*, 1975). Actualmente también se les denomina barriles- $(\beta\alpha)_8$  y sus características se detallan a continuación.

Los barriles TIM o barriles- $(\beta\alpha)_8$  canónicos están conformados por aproximadamente 200 aminoácidos y su estructura se define por la repetición de ocho veces el motivo hebra $\beta$ -asa-hélice $\alpha$ -asa (Fig. 2). Las hebras- $\beta$  conforman el interior del barril o el centro hidrofóbico y se disponen en paralelo con un ángulo de inclinación de  $36^\circ$  con respecto al eje principal. Sus cadenas laterales forman líneas perpendiculares que brindan estabilidad al plegamiento; mientras que los puentes de hidrógeno que se forman entre el extremo amino y carboxilo terminales de las hojas- $\beta$  son los encargados de cerrar el barril (Wierenga, R.K., 2001). Las hélices- $\alpha$  se ubican en la superficie del barril y forman una cubierta que rodea el centro hidrofóbico y que favorece su solubilidad. Por la suma de las interacciones como la formación de microdipolos y campos electrostáticos dipolares de las hélices- $\alpha$  se crea un potencial positivo en la cara catalítica del barril TIM, algunas cadenas laterales de las hélices- $\alpha$  incrementan el campo electrostático muy cerca del sitio activo lo que puede sugerir una preferencia de estas enzimas por metabolitos con carga negativa. La literatura reporta que existen propiedades electrostáticas conservadas que permiten la catálisis óptima y que la conservación de residuos polares, no polares y con carga eléctrica es significativa en el plegamiento TIM (Livesay, D. and David, L. 2006).

Los aminoácidos que forman el sitio activo de los barriles- $(\beta\alpha)_8$  se localizan en el extremo carboxilo terminal de las hebras- $\beta$  comprendiendo parte de las asas que unen las hojas- $\beta$  a las hélices- $\alpha$  (asas  $\beta$ - $\alpha$ ), estas asas son hipermutables lo que sugiere la posibilidad de intercambiar la actividad catalítica sin comprometer la estabilidad de plegamiento (Gerlt, 2000; Vadrevu, et al, 2003; Livesay & La, 2006). Otro aspecto importante en la composición estructural de los barriles es la clara diferencia de funciones de las asas que los componen; gracias a los resultados de diversos

los barriles- $(\beta\alpha)_8$ , hoy se afirma que las asas que conectan las hebras- $\beta$  con las hélices- $\alpha$  (asas  $\beta$ - $\alpha$ ) conservan residuos importantes para la catálisis, mientras que las asas que conectan las hélices- $\alpha$  con las hebras- $\beta$  (asas  $\alpha$ - $\beta$ ) están directamente relacionadas con la estabilidad de plegamiento, la evidencia experimental también respalda el hecho de que las asas que forman el sitio activo son flexibles y por consiguiente pueden ser mutadas sin desestabilizar el andamiaje (Urfer, R. & Kirschner, K., Wierenga, R.K. 2001).



**Figura 2.** Plegamiento barril  $(\beta\alpha)_8$  caracterizado por la repetición de ocho motivos hebra- $\beta$ -asa-hélice- $\alpha$ -asa, (A) tomando como modelo la enzima TIM de *Trypanosoma brucei* (B) vista lateral de PRAI de *Thermotoga maritima* y (C) modelo topológico de estructura secundaria para un barril- $(\beta\alpha)_8$  canónico. Tomado de Höcker, B. 2005.

## EVOLUCIÓN DEL PLEGAMIENTO DE BARRIL TIM

En 1945, año de la publicación de “Sobre la Evolución de las Rutas Biosintéticas”, Nathaniel H. Horowitz reúne y aplica conceptos de índole evolutivo, genético y químico para dar origen a una de las teorías que cambiaría la percepción de múltiples ámbitos de la Bioquímica. La teoría propone que cada una de las rutas biosintéticas tiene igual número de genes que de enzimas contenidas para una ruta dada, donde sólo una enzima cataliza una reacción propia; además, desde el punto de vista evolutivo, es permisible

primera instancia para dar origen a las enzimas que la anteceden, considerando la disponibilidad de los intermediarios, el efecto de las mutaciones, la presión de selección y, la fijación de estos cambios significativos para la función catalítica dentro de un linaje; así mismo, generó nuevas enzimas capaces de reconocer un sustrato de reciente generación y, probablemente, la disminución en el número de reacciones químicas dentro de la ruta, donde también se advierte que existe la conservación de la estructura y la especificidad por el sustrato en cada una de las enzimas involucradas dentro de la ruta (Horowitz, N.H., 1945).

En 1965, veinte años después de la primera publicación de su teoría, Horowitz decide modificarla. Ahora la idea central versa sobre el producto de una enzima como el sustrato de la que le sucede dentro de una ruta dada, por lo que un sitio de unión al sustrato no necesita ser re-inventado si las enzimas son homólogas y pertenecen a una misma ruta biosintética. Bajo este último argumento, R.A. Jensen, en 1976, concibe una forma alternativa de explorar la evolución de las rutas biosintéticas: hace referencia al reclutamiento de enzimas, concepto dentro del cual enfatiza la viabilidad de incorporar a una ruta enzimas que catalizan reacciones químicas similares aunque provenientes de otras rutas metabólicas; dicha situación advierte la clara homología entre las enzimas involucradas. El modelo de mosaico o reclutamiento —*patchwork*— considera que las enzimas promiscuas tienden a catalizar reacciones químicas similares aun cuando actúan sobre diferentes tipos de sustratos. El modelo de mosaico propone que la duplicación de genes que codifican para enzimas promiscuas permite que cada enzima descendiente se especialice en una de las reacciones ancestrales. Así, las enzimas generadas en el esquema del mosaico pueden catalizar reacciones a una gran distancia dentro de la ruta metabólica, y el tipo de reacción química que catalizan, cuando son enzimas consecutivas dentro de la ruta, es similar y la estructura de las enzimas está relacionada entre sí en pasos contiguos de reacción. Con base en un análisis *in silico*, se propone que el modelo del mosaico es el más común para generar la versatilidad química y estructural de las enzimas que componen las rutas metabólicas; sin embargo, se ha observado que deben acoplarse las teorías del mosaico y reclutamiento para extender el conocimiento sobre la evolución de las rutas metabólicas y de sus componentes proteicos, porque es necesario equiparar y aplicar conceptos como reclutamiento de enzimas, duplicación génica, divergencia y promiscuidad enzimática, con la finalidad de detectar las relaciones filogenéticas de las enzimas y su relación con

los sustratos y productos presentes en las rutas metabólicas (Díaz-Mejía, J.J. et al. 2008). Hoy en día, los esfuerzos para responder preguntas en torno al mecanismo empleado para retener un mecanismo catalítico en enzimas homólogas no han disminuido; por el contrario, las evidencias actuales sugieren que este proceso de reclutamiento ha ocurrido para diversas familias de proteínas dentro de rutas metabólicas específicas, como es el caso para algunos miembros de la familia de los barriles- $(\beta\alpha)_8$ , también conocidos como barriles TIM (Copley, R. & Bork, P., 2000). En las rutas de biosíntesis de triptofano e histidina, y en la ruta de glucólisis (Thornton, J. et al. 1999) se ha observado la dominancia de esta arquitectura, característica que alude la posibilidad de sustentar los postulados de N.H. Horowitz y R.A. Jensen; porque además de compartir su arquitectura, la similitud de las reacciones químicas que catalizan, los cofactores que utilizan y la estructura de los sustratos son similares.

Como ya se ha mencionado, por ser el plegamiento más recurrente en la base de datos y por tratarse de enzimas que catalizan reacciones en el metabolismo central, la posibilidad de elucidar la filogenia de los barriles TIM no se ha hecho esperar. La primera explicación que provocó revuelo en torno a este problema propone el origen monofilético del plegamiento, aludiendo a una enzima ancestral que por un proceso de divergencia combinado con mutaciones en el espacio de secuencia y su respectiva presión de selección, se especializa en las diferentes reacciones catalíticas. Esta teoría tiene mayor aceptación porque existe evidencia experimental que la apoya, sin embargo, el bajo grado de identidad que comparten varios de los barriles TIM actuales no permite descartar la posibilidad de una teoría alternativa que explique su origen; así, una segunda opción remite a un proceso de evolución convergente que no ha sido totalmente aceptado en el campo experimental (Theobald, D. & Wuttke, D., 2005).<sup>3</sup>

Copley y colaboradores en el año 2000, elaboran un análisis estadístico usando secuencias de proteínas homólogas que participan en rutas del metabolismo central, y llegan a la siguiente conclusión: que al menos 12 de 23 superfamilias de barriles  $(\beta\alpha)_8$  de la base de datos SCOP comparten un origen común, es decir, que a partir de una proteína ancestral con plegamiento estable de barril, evolucionaron enzimas que adquirieron actividades catalíticas diversas como resultado de eventos de mutación

---

<sup>3</sup> Dado que esta segunda propuesta carece de sustento experimental para los fines de este trabajo es

azarosa, recombinación y selección natural; el análisis establece que el ancestro común es una enzima que tiene un sitio de unión a fosfatos, característica que define a la mayoría de los miembros de esta familia (Copley, R. and Bork, P., 2000). Un análisis similar lo hace Nagano en el año 2000, en este caso analiza las enzimas de la base de datos CATH, y considera para el análisis la estructura, la función, el plegamiento y la historia evolutiva de las enzimas registradas; y menciona que existen actualmente en CATH aproximadamente 900 estructuras con plegamiento de barril TIM a partir de 503 entradas del PDB, de las cuales 18 de 21 pertenecen a una familia homóloga. Y cuando se analiza el tipo de reacción química, las enzimas con arquitectura de barril TIM catalizan 5 de los 6 tipos admitidos por la Comisión de Enzimas, predominando sobre todas las que actúan como hidrolasas. Y sobre la evidencia de su historia evolutiva divergente, existe una característica que apunta en esta dirección: los sitios de unión a fosfato se localizan en el asa 7, asa 8 y en la pequeña hélice 8; de esta forma, se piensa que existe un plegamiento tipo que puede desempeñar diversas reacciones catalíticas y su evolución es, muy probablemente, divergente (Nagano, N., et al. 2002). El origen monofilético se pone de manifiesto bajo el argumento de que existe una conservación espacial del sitio activo en la región carboxilo terminal de las hebras- $\beta$ , siendo ésta otra característica que define a los barriles TIM (Vega, C., et al. 2003). Las enzimas que apoyan esta teoría de divergencia son algunos miembros de la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos: triptofano e histidina. La promiscuidad enzimática es un concepto que atañe a esta teoría porque, dado el presunto origen monofilético de estas enzimas, en algún momento intermedio del proceso de divergencia el ancestro posiblemente fue capaz de reconocer y catalizar diversas reacciones en una amplia variedad de sustratos siguiendo una estrategia química similar o diferente para resolver el problema de su catálisis, proceso dependiente de la habilidad de la proteína para alterar su función con un número reducido de sustituciones (característica llamada plasticidad). La promiscuidad enzimática ha sido ejemplificada en varios casos: la proteína HisA, una enzima que con un par de modificaciones en su sitio catalítico fue capaz de complementar la función de TrpF en una cepa  $\Delta trpF$  (Jürgens, C., et al. 2000); por otro lado, en el caso de las Aldolasas L-Ala-D/L-Glu epimerasa (AEE) y la enzima Lactonizante del Muconato (MLE II), se obtuvieron enzimas capaces de reconocer y catalizar la reacción de la enzima *o*-succinilbenzoato sintetasa (OSBS). Estas enzimas son miembros de la superfamilia MLE de las aldolasas, conservan el residuo lisina

y una base, pero siguiendo diferentes mecanismos químicos. La comparación estructural de AEE y OSBS de *E. coli* permitió el diseño racional de la mutante AEE D297G, mientras que la mutante MLEII E323G fue seleccionada como resultado de la amplificación por PCR y mutagénesis al azar del gene de MLE II de *Pseudomonas* sp. Las dos mutantes fueron transformadas en una cepa auxótrofa OSBS para probar la complementación genética, mientras que las curvas de crecimiento anaeróbico para cada una de las complementaciones y los ensayos cinéticos con las mutantes AEE D297G y MLEII E323G son experimentos que revelan la promiscuidad funcional de estas variantes para catalizar la reacción de la enzima OSBS (Schmidt, D., *et al.* 2003).

Entender el mecanismo por el cual las enzimas promiscuas adquirieron su función actual y cómo la plasticidad de los residuos contribuye al proceso de evolución natural ayudaría a formular metodologías eficientes para diseñar enzimas *de novo* capaces de reconocer sustratos específicos. (Nagano, *et al.*, 2002; Copley, R. & Bork, P., 2000., Henn-Sax, M., *et al.* 2002., Gerlt, J & Babbitt, P., 2001., Tawfik, D., 2006., Yoshikuni, Y., *et al.* 2006., Aharoni, A. *et al.* 2005., Vega, M., *et al.* 2003).

El número limitado de tipos de plegamientos, con base en la información depositada en el PDB, el registro asciende a 3 500 plegamientos, número que es mucho menor al de enzimas con actividades diversas codificadas por los genomas de los tres dominios —Archaea, Bacteria y Eukarya— que han sido secuenciados (Apic, G *et al.*, 2001). Por esta razón, se piensa que un tipo de plegamiento que ha sido resultado de la evolución divergente puede ser aprovechado tantas veces como sea necesario, o que por evolución convergente fueron diseñados varios tipos de manera independiente en múltiples ocasiones; cualquiera que sea la estrategia adoptada, todos los plegamientos conocidos hasta la fecha están representados por todas las proteínas de los genomas de los tres dominios. La existencia de *familias* y *superfamilias* —grupo de proteínas que han evolucionado de un ancestro común, y que comparten similitudes estructurales perceptibles aun cuando la identidad de sus secuencias es diferente— apoya la teoría de la divergencia, porque las proteínas que se clasifican en una superfamilia han conservado la especificidad por sustratos relacionados y han usado la arquitectura de su sitio activo para catalizar diferentes tipos de reacción química; los ejemplos que representan estas propuestas son las enzimas PRAI, IGPS y TS $\alpha$ , tres enzimas que catalizan reacciones sucesivas en la biosíntesis de triptofano, y las enzimas HisA e

HisF, las cuales catalizan dos reacciones sucesivas en la biosíntesis de histidina. La variabilidad de identidad de los residuos catalíticos en las enzimas PRAI, IGPS y TSα ejemplifican la flexibilidad del plegamiento ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> en su evolución natural; si bien es cierto que estas enzimas comparten características estructurales que, se piensa, evolucionaron para usar un conjunto específico de residuos capaces de catalizar reacciones diferentes; por estas razones, dichas enzimas se han tomado como modelos para ejemplificar y estudiar mecanismos operables de evolución divergente (Wise, E. and Rayment, I., 2004). Es importante mencionar que los millones de años de deriva génica han dado como resultado cambios en la secuencia que oscurecen la ruta exacta por la cual las enzimas divergieron, por lo que es imposible definirla con precisión (Gerlt, J. & Babbit, P., 2001., Tawfik, S., 2006., Khersonsky, O., *et al.* 2006).

Estos y otros ejemplos que se ocupan de la teoría de divergencia enzimática sirven como paradigma para tratar de comprender los requerimientos estructurales y funcionales esenciales para la evolución de nuevas enzimas en el ámbito experimental (Wise, E. and Rayment, I., 2004).

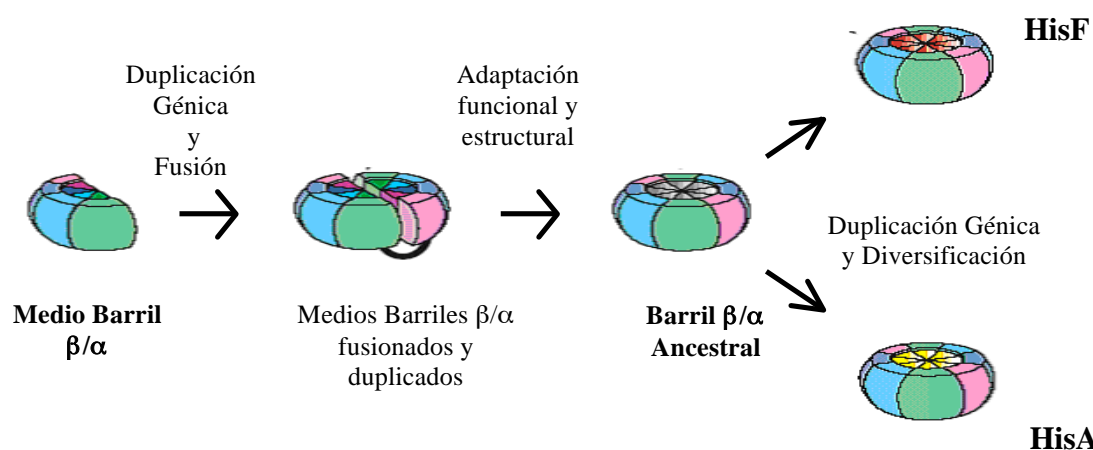
Por otra parte, se propone que los dominios proteicos<sup>4</sup> son las unidades evolutivas de las proteínas y que la presencia de eventos de duplicación, recombinación y fusión de genes fueron determinantes para originar las estructuras actuales de las proteínas. De esta manera, se puede sugerir que los dominios de una misma familia pudieron sufrir duplicaciones, cuyo resultado es la presencia de dos dominios en tándem; o bien, sufrir duplicaciones sucesivas, originando dominios consecutivos (Apic, G., *et al.* 2001). Así, una teoría plantea que la fusión de genes que codificaban para la mitad de un barril ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub> ancestral dio origen a la actual arquitectura del barril ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> (Fig. 3) y la única evidencia experimental generada para esta teoría se refiere al caso de las enzimas HisA e HisF —esta es una teoría que ha sido demostrada experimentalmente, empero, ello no significa que es determinante para todos los miembros de la familia, ya que existen otros ejemplos que no dejan ver si son producto de duplicaciones: ¿Cómo se explicaría, bajo este esquema, la arquitectura de un barril ( $\beta\alpha$ )<sub>6</sub>? (Höcker, *et al.* 2001, Lang, D., *et al.* 2000., Gerlt, J. and Raushel, F. 2003)—; los autores, después de hacer

---

<sup>4</sup> Dominio proteico: En biología estructural, un dominio es definido como la unidad compacta y estable que se pliega independientemente del efecto de otras unidades o dominios. En la taxonomía de proteínas, el dominio constituye el nivel más alto dentro de la jerarquía y es la base para clasificar a las proteínas

un alineamiento estructural y de secuencias, concluyen que dichas enzimas exhiben una clara duplicación de sus estructuras. El hallazgo de las dos duplicaciones sucesivas puede tratarse del módulo ancestral que probablemente originó los genes *hisA* e *hisF* y sus homólogos, hecho que fortalece esta teoría. Se piensa que estas enzimas descienden de un gene que codificaba para una enzima poco específica y bifuncional; la evidencia se sustenta en que la proteína HisF es capaz de interactuar, con poca afinidad, con 5' – ProFAR, el sustrato de la enzima HisA. Se propone que el reconocimiento de este sustrato por ambas enzimas es debido a la presencia de un motivo estructural hebra  $\beta$ -hélice  $\alpha$ -hebra  $\beta$  apto para unir regiones de glicerol-fosfato, pero también se advierte de la posibilidad de que 5'–PRFAR o 5'–ProFAR<sup>5</sup> fueron tomados como sustratos por una enzima HisA ancestral. Estos resultados apoyan la idea de que una ruta biosintética ancestral de histidina evolucionó a partir de una enzima primitiva que catalizaba dos o más reacciones similares y que su especialización llegó con los eventos de duplicación génica (Alifano, P. et al. 1996).

Con base en los resultados publicados, el presente trabajo busca explorar un mecanismo operable de evolución de proteínas, apoyado por estrategias de evolución dirigida y diseño racional, con la finalidad de buscar nuevas actividades catalíticas; y para conformar el diseño se toma como andamiaje modelo dos enzimas homólogas: PRAI y la subunidad alfa de triptofano sintetasa.



**Figura 3.** Modelo que representa la evolución del plegamiento de barril  $\beta/\alpha$  por duplicación génica. La primera duplicación genera dos mitades idénticas que se fusionan y adaptan para dar origen a un barril  $\beta/\alpha$  ancestral. Un segundo evento de duplicación génica da lugar a la diversificación de actividades catalíticas para este plegamiento. Modificado de Lang, D., *et al.* 2000.

<sup>5</sup> PRFAR: N<sup>5</sup>-I(5'-fosforribulosil)-formimino-1-5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleótido



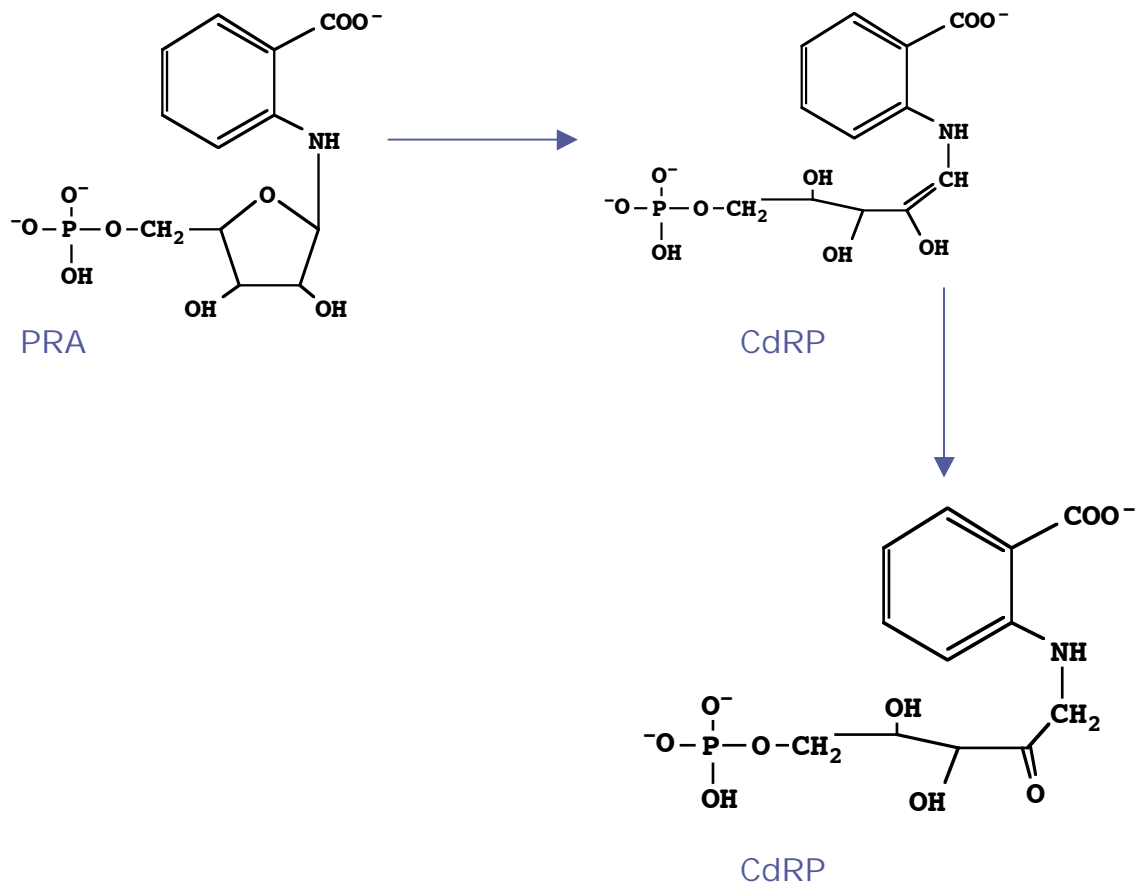
En el presente trabajo se emplea la versión modificada de la enzima PRAI de *E. coli*. En *E. coli*, PRAI forma parte de una cadena polipeptídica bifuncional, en la cual se fusiona a la enzima IGPS y es codificada por el gen *trpFC* del operón de triptofano. En primera instancia, cuando el el gen *trpFC* de *E. coli* fue sometido a un diseño de ingeniería para obtener el monómero funcional de PRAI —proteína codificada por el gene *trpF*— (Eberhard, M., et al. 1995) y este monómero a su vez fue modificado en el laboratorio del Dr. Xavier Soberón, de tal manera que se fragmentó a la enzima PRAI en dos mitades ( $\beta 1-\alpha 4$  y  $\beta 5-\alpha 8$ ) capaces de complementarse *in vivo* para funcionar como PRAI (Soberón, X., et al. 2004). Una vez reconocido un sitio de corte que permitió identificar unidades de plegamiento independiente, se introdujo en ese sitio la secuencia LoxP511 —sitio de reconocimiento de la proteína Cre recombinasa— y se clonó en el vector pDAN5 bajo los sitios de restricción HindIII y NheI. Mediante ensayos de complementación genética se confirmó que esta enzima, ahora llamada PRAI-Crelox, permaneciera funcional (Saab-Rincón, G., et al. 2005). La clonación de este gen en el vector pDAN5 se hizo con el objetivo de hacer posible la recombinación *in vivo* de las dos mitades del gen haciendo uso del sistema CreLox e incrementar la eficiencia de las librerías de mutantes ( $>10^{10}$  variantes), como se ha demostrado para la generación de anticuerpos con alta variabilidad (Sblattero, D. and Bradbury, A. 2001). Las principales ventajas que ofrecería la recombinación con este sistema son: recombinar las librerías primarias entre sí, *in vivo*, y crear una segunda librería más grande que no esté limitada por la eficiencia de la clonación (Sblattero, D., et al. 2000., Saab-Rincón, G., et al. 2005). Dentro del proyecto hay dos características relevantes para elegir este plegamiento, una de ellas, que se ha comprobado y definido muy claramente, es la referente a la división de su estructura —una cara catalítica y una cara estructural—; la segunda, aborda la conservación del sitio catalítico dentro del motivo hebra- $\beta$ -asa-hélice- $\alpha$  tal como se ha definido para los miembros de esta familia, razón por la cual se le ha elegido para introducir variabilidad en la región carboxilo terminal de las hebras- $\beta$  y para translocar e intercambiar asas homólogas en cualquier otra asa de la cara catalítica que establece contacto con el sustrato; cuando se hayan translocado las asas se advierte la posibilidad de utilizar el sistema Cre-Lox (Saab-Rincón, G., et al. 2005) para incrementar la variabilidad de las librerías generadas y someterlas a métodos de tamizaje y selección con la finalidad de explorar diferentes funciones catalíticas.

El intercambio de asas de proteínas homólogas es una propuesta que vislumbra la generación de enzimas con funciones catalíticas novedosas (Tawfik, D., 2006), y cabe señalar que existe una variabilidad importante en la longitud y composición de residuos de las asas de la cara catalítica para los barriles cuya estructura ha sido comparada. Esta diferencia, se asume, es una consecuencia de la adaptación de las enzimas para su óptima función catalítica (Wilmanns, M., *et al.* 1991). Para desarrollar este proyecto es necesario tener un amplio conocimiento de las estructuras y mecanismos catalíticos de las enzimas elegidas. Porque se propone que el plegamiento de barril- $(\beta\alpha)_8$  fue una innovación de la naturaleza para catalizar diferentes tipos de reacciones químicas sin comprometer su estabilidad y porque dentro de la ingeniería de proteínas se le ha elegido como un candidato fehaciente ya que se le ha sometido a cambios drásticos en su espacio de secuencia sin perder su plegamiento (Patrick, W. and Blackburn, J., 2005), para este proyecto se ha elegido a un miembro de la familia de los barriles TIM: la enzima PRAI de *E. coli*, a la que también en este proyecto se le ha translocado la secuencia del asa catalítica 6 de la subunidad alfa de triptofano sintetasa de *E. coli*. Las enzimas PRAI y la subunidad alfa de triptofano sintetasa son proteínas homólogas, su identidad de secuencia es de 30.7%, el 50-75% de sus residuos son estructuralmente equivalentes y su alineamiento estructural indica que el asa 6 de cada una de estas dos enzimas es flexible e interviene directamente en la unión de sustrato para formar una tapa flexible sobre el sitio activo (Wilmanns, M., *et al.* 1991). Los residuos catalíticos de PRAI son la cisteína 7 (Cys7) y el ácido aspártico 126 (D126), mientras que los residuos catalíticos de la subunidad alfa de la enzima triptofano sintetasa son el  $\alpha$  ácido aspártico 60 ( $\alpha$ Asp60) y la  $\alpha$  treonina 183 ( $\alpha$ Thr183).

### 1.3 FOSFORRIBOSIL ANTRANILATO ISOMERASA: PRAI (E.C. 5.3.1.24; PDB 1PII)

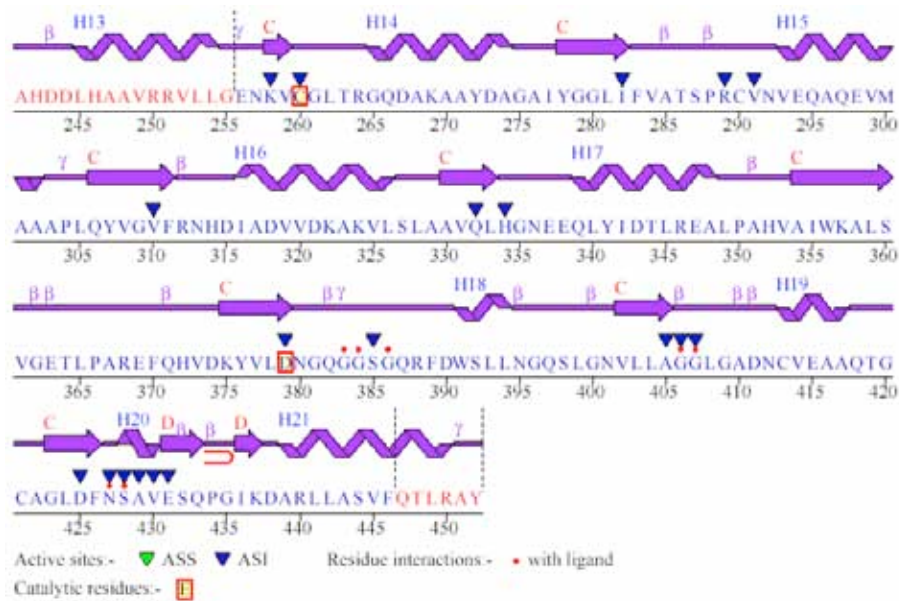
La enzima fosforribosil antranilato isomerasa, PRAI, cataliza el tercer paso en la ruta de biosíntesis de triptofano, tiene un peso aproximado de 23 kDa, es codificada por el gen *trpF* y pertenece a la familia de los barriles- $(\beta\alpha)_8$ . PRAI es uno de los barriles más pequeños con apenas 197 residuos, sin elementos de estructura secundaria adicionales que le precedan en la hebra beta 1 o se agreguen en la hélice alfa 8 y, curiosamente, la hélice- $\alpha$  5 ha sido reemplazada por un asa (Wilmanns, M., *et al.* 1991). En *E. coli*, PRAI forma parte de una cadena polipeptídica bifuncional, en la cual se fusiona a la

gen *trpFC* del operón de triptofano. Este complejo cataliza dos reacciones continuas en la ruta de biosíntesis de triptofano. PRAI cataliza una reacción Redox intramolecular o también llamada rearreglo de Amadori (isomerización irreversible de una aminoaldosa fosforilada a una aminocetosa fosforilada) donde el sustrato N-(5'-fosforribosil)-antranilato (PRA) es convertido a 1-(o-carboxifenilamino)-I-deoxirribulosa 5-fosfato (CdRP) (Fig. 4). La reacción consiste, en *grosso modo*, en la transferencia de protones entre las moléculas involucradas, cuyo producto inicial es una enolamina y el siguiente producto, se piensa, es la tautomerización de la  $\alpha$ -amino cetona; sustrato putativo de la enzima IGPS (Hommel, U., *et al.* 1995). El fundamento químico del rearreglo de Amadori que cataliza PRAI es una reacción ácido-base donde los residuos cisteína 7 (C7) y ácido aspártico 126 (D126) actúan como base y ácido, respectivamente; también se habla de la formación de una base de Schiff como intermediaria en la catálisis. El residuo Asp126 protona el oxígeno del anillo de furanosa, y el residuo Cys7 abstrae un protón del átomo C2' de la ribosa, dando como resultado la apertura del anillo de ribosa. Los residuos catalíticos se sitúan en las siguientes posiciones: el residuo C7 está localizado en la región carboxilo terminal de la hebra- $\beta$  1, mientras que el residuo D126 en la hebra- $\beta$  6 de PRAI (Henn-Sax, M., *et al.* 2002).



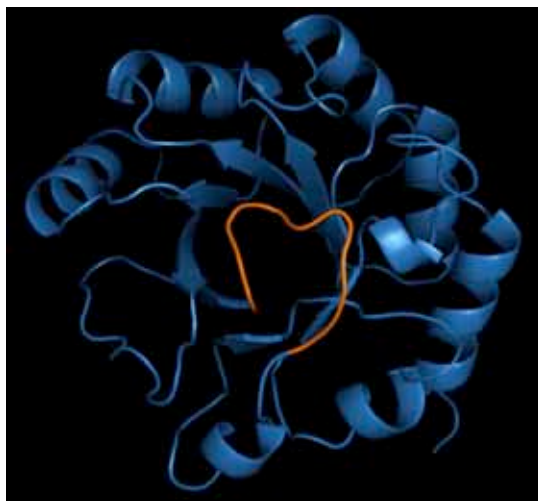
**Figura 4.** Reacción catalizada por la enzima PRAI. El sustrato N-(5'-fosforribosil)-antranilato (PRA) es convertido a 1-(o-carboxifenilamino)-1-deoxirribulosa 5-fosfato (CdRP). Rearreglo de Amadori: isomerización irreversible de una aminoaldosa a una aminocetosa con la correspondiente apertura del anillo de ribosa.

La longitud de la cadena polipeptídica que comprende el complejo bifuncional PRAI-IGPS es de 452 residuos. IGPS se extiende desde el residuo 1 hasta el 255 y PRAI desde el 256 hasta el 452 (Fig. 5). La unión de los dos dominios está dada por interacciones no covalentes entre la última hélice- $\alpha$  del dominio IGPS y una asa corta entre la primera hélice- $\alpha$  y la segunda hebra- $\beta$  de PRAI. En organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* y *Thermotoga maritima* PRAI es un monómero, no obstante, en el caso de *E. coli* el complejo IGPS:PRAI ha sido modificado por ingeniería genética de tal manera que cada uno de los dominios puede ser expresado como un monómero independiente, estable y totalmente funcional (Eberhard, M., *et al.* 1995)



**Figura 5.** La longitud de la cadena polipeptídica que comprende el complejo bifuncional PRAI-IGPS de *E. coli* es de 452 residuos, PRAI se extiende desde el residuo 256 hasta el 452. Los residuos catalíticos C7 y D126 están señalados en una casilla de color rojo. Tomado de <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>

La importancia del asa 6 (Fig. 6) de la enzima PRAI se deriva de un experimento realizado por Patrick y Blackburn (Patrick, W. & Blackburn, J. 2005) en el cual investigan la plasticidad de esta asa mediante la inserción del epítipo FLAG; el resultado es la obtención de una mutante PRAI (PRAI-FLAG) carente de actividad catalítica, efecto esperado porque se sabe con base en otros experimentos el papel fundamental de dicha asa en la función de esta enzima. La información recopilada señala varios aspectos: i) el asa 6 conecta la hebra- $\beta$  6 con la hélice- $\alpha$  6, ii) forma una tapa larga y flexible que cubre la superficie de la cavidad del sitio activo, iii) se piensa que es una asa móvil que adopta diferentes conformaciones en presencia y ausencia del ligando y iv) en esta asa se localiza el residuo catalítico D127. Por otra parte, por un análisis con Dicroísmo Circular de la mutante PRAI-FLAG, se observó que la inserción del epítipo no perturbó drásticamente el plegamiento del barril- $(\beta\alpha)_8$ , experimento que demuestra una vez más la enorme flexibilidad que tiene esta familia para soportar cambios en su secuencia sin afectar su plegamiento (Patrick, W. & Blackburn, J. 2005).



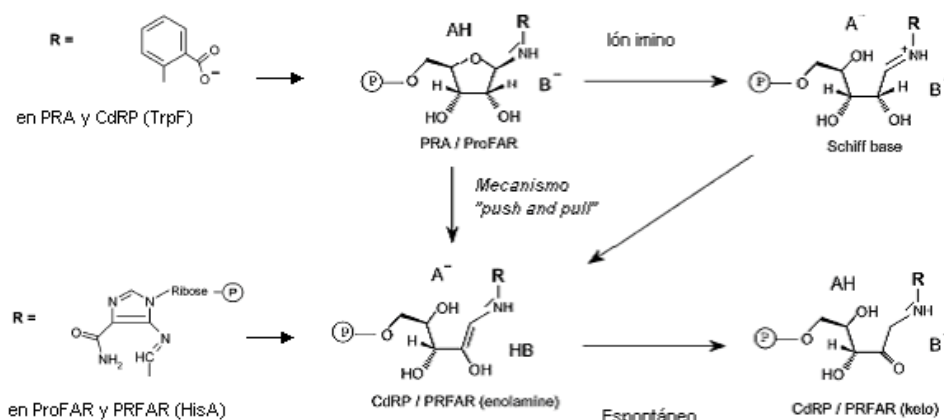
**Figura 6.** La enzima PRAI de *E. coli*, un barril  $(\beta\alpha)_8$  (Priestle, J.P., *et al.* 1987). PDB: 1PII. E.C.: 5.3.1.24. En naranja: asa-6. Modelo generado en PyMol.

La superposición estructural de PRAI e IGPS indica una clara diferencia en las regiones carboxilo terminal de las hojas- $\beta$ ; IGPS posee un extremo amino terminal más largo y las asas que conectan la primera y la sexta hoja- $\beta$  con sus respectivas hélices- $\alpha$  difieren significativamente en longitud, secuencia y estructura; mientras que el resto de los aminoácidos estabilizan la conformación tridimensional para la unión del sustrato. El alineamiento estructural de estas dos enzimas, en presencia de su respectivo sustrato, reveló que la unión de la ribulosa es de forma muy similar dentro de una región conservada del sitio activo y que su similitud estructural es inmensa, información decisiva para establecer una relación filogenética entre ambas enzimas (Gerlt, J.A., 2000).

Dentro de la filogenia de los barriles TIM existen dos enzimas que pertenecen a la misma familia estructural de los barriles  $(\beta/\alpha)_8$  y comparten el mecanismo catalítico conocido como arreglo de Amadori —conversión de aminoaldosa a su correspondiente aminocetosa—. Estas dos enzimas son: PRAI e HisA. La hipótesis de que estas proteínas evolucionaron de un ancestro común parte de la comparación de sus estructuras y de la similitud en la reacción química que desempeñan en su catálisis, aunque su similitud de secuencia es sólo de aproximadamente 10%; la ubicación relativa de sus residuos catalíticos es muy similar (HisA: D8, D127 y T164; PRAI: C7 y D126) (Henn-Sax, M., *et al.* 2002). Así, se propone que estas dos enzimas, por divergencia, evolucionaron de un ancestro común capaz de reconocer una amplia gama

Dentro de las implicaciones del mecanismo catalítico de estas enzimas se consideran dos estrategias que previenen la pérdida de un metabolito lábil como lo son el N-(5'-fosforribosil)-antranilato (PRA) y el 1-(*o*-carboxifenilamino)-1-deoxirribulosa 5-fosfato (CdRP), y son las siguientes: i) transferencia directa de los metabolitos utilizando un túnel hidrofóbico formado por la estructura de las dos enzimas involucradas en la catálisis, y ii) convertir el metabolito lábil a un producto más estable pero de rápido recambio preparado para ser catalizado ágilmente por la siguiente enzima de la ruta (Küper, J., *et al.* 2005., Henn-Sax, M. *et al.* 2002, Leopoldseder, S. *et al.*, 2004).

Por la similitud de las reacciones catalizadas por estas dos enzimas se sugiere que, en un primer paso, el oxígeno del anillo de furanosa de PRA (sustrato de la enzima TrpF) o ProFAR (sustrato de la enzima HisA) es protonado por el ácido AH, produciendo una base de Schiff (ión imino) que funge como intermediario. Posteriormente, un protón es abstraído del átomo C2' de la ribosa por la base B<sup>-</sup> que produce a su vez la forma enolamina de CdRP (TrpF) o PRFAR (HisA). El mecanismo alternativo para generar la enolamina es por un mecanismo llamado “*push and pull*”, el cual requiere que el ácido y la base actúen de forma simultánea. La conversión de la forma enolamina de CdRP a la forma ceto ocurre de forma espontánea, y esta conversión es independiente de la concentración de enzima presente (Fig. 7) (Henn-Sax, M., *et al.* 2002).



**Figura 7.** Posible mecanismo de reacción de rearreglo de Amadori catalizado por las enzimas TrpF e HisA. El ácido AH y la base B<sup>-</sup> corresponde a los residuos Asp126 y Cys7, respectivamente en el caso de TrpF (Modificado de Henn-Sax, M., *et al.* 2002)

El grupo de R. Sterner, con la finalidad de comparar los mecanismos de reacción de las enzimas HisA y TrpF y las estrategias usadas por estas dos enzimas para proteger sus sustratos termolábiles, utiliza como modelo la enzima HisA de *Thermotoga maritima*; ambas enzimas catalizan una reacción ácido-base donde participan aminoácidos estructuralmente conservados. El gen que codifica para tHisA fue sometido a mutagénesis al azar y numerosos ciclos de selección genética *in vivo*. Sus resultados fueron contundentes: Seleccionaron una variante capaz de complementar la función de una cepa *trpF*-, y la característica que la distingue es un sólo cambio en la secuencia aminoacídica en el andamiaje de HisA. Con una sola mutación, la enzima resultante logró cambiar la especificidad de sustrato y catalizar la reacción correspondiente a la enzima PRAI; aun con el remanente de actividad de HisA. El cambio al que se hace mención fue Asp127Val, cambio que ha causado gran expectativa dentro de la ingeniería de proteínas y en el ámbito evolutivo. El residuo Asp127 de tHisA, inicialmente, actuaba como ácido en la catálisis, pero con el cambio por el residuo Valina, la reacción química no puede abordarse desde el mismo punto de vista, porque en este caso, sería otro aminoácido el que podría fungir como ácido en la reacción catalítica (Küper, J., *et al.* 2005., Henn-Sax, M. *et al.* 2002, Leopoldseder, S. *et al.*, 2004).

#### TRIPTOFANO SINTETASA. (E.C. 4.2.1.20; PDB 1WQ5)

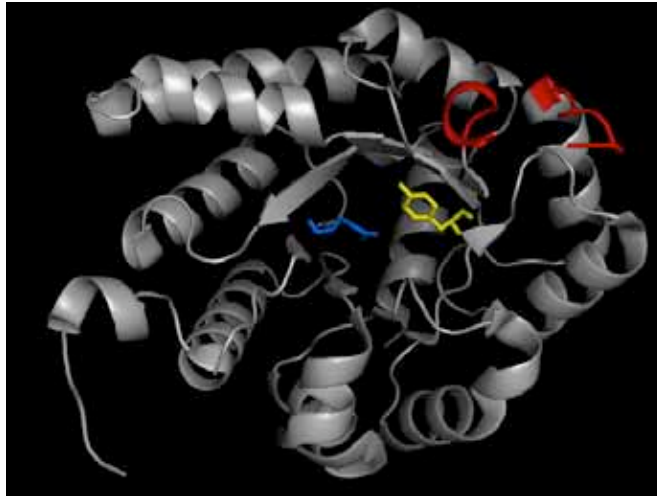
La duplicación y fusión de genes se advierten como dos mecanismos asociados a la evolución de algunas rutas metabólicas. Dentro del genoma de las bacterias han sucedido fusiones de genes. Estas fusiones, se presume, han creado genes que codifican para enzimas multifuncionales relacionadas entre sí por su estructura, su secuencia y/o su función. Las enzimas multifuncionales representan una estrategia efectiva para asegurar la síntesis coordinada de productos y sustratos dentro de una ruta biosintética; las rutas de biosíntesis de histidina y triptofano manifiestan la presencia de enzimas multifuncionales en reacciones catalíticas sucesivas. La ruta biosintética del triptofano es una de las tres rutas dentro de la filogenia que, se piensa, divergió de una ruta común cuyo componente inicial es el corismato; pero no sólo existe la hipótesis de un origen monofilético a nivel químico, sino también a nivel estructural como lo muestran las últimas tres enzimas en la ruta de biosíntesis de triptofano: IGPS, PRAI y TRPA; enzimas evolutivamente relacionadas porque todas ellas, con base en un análisis



estructural y de comparación de secuencias, comparten un plegamiento de barril- $(\beta\alpha)_8$  y un sitio de unión a fosfato (Wilmanns, M., *et al.* 1991). La superposición estructural de las enzimas IGPS, PRAI y TRPSA demuestra que existe un sitio de unión a fosfato común para las tres enzimas localizado en la asa que une la hebra- $\beta$  7 a la hélice- $\alpha$  7 y en la región amino terminal de la hélice 8' con un porcentaje de similitud de 50-75%, mientras que la similitud global de sus secuencias oscila entre 13.6–17.8% (Wilmanns, M., *et al.* 1991). El sitio catalítico de las tres enzimas está localizado, como en todos los barriles, en la región carboxilo terminal de una hebra- $\beta$ , aun cuando su mecanismo de reacción es diferente (Wise, E. and Rayment, I., 2004).

La enzima triptofano sintetasa de *E. coli* es un heterotetrámero estable conformado por 2 dominios funcionales: dos subunidades alfa y dos subunidades beta ( $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ ) que catalizan las dos últimas reacciones en la ruta de biosíntesis de triptofano y cada una de las subunidades está codificada en el operón de triptofano por los genes *trpA* y *trpB1*, respectivamente. La subunidad- $\alpha$  en su forma monomérica la integran un total de 268 residuos, su peso aproximado es de 29 kD, por su topología es clasificada dentro de la familia de los barriles- $(\beta\alpha)_8$  y como tal, su sitio catalítico se localiza en el extremo carboxilo terminal de la hebra- $\beta$  6 y en el extremo amino terminal de la hélice- $\alpha$  6, mientras que los grupos funcionales se sitúan en las asas que unen a las hojas- $\beta$  con las hélices- $\alpha$  (asas  $\beta\alpha$ ); el homodímero- $\beta\beta$  tiene un peso aproximado de 94 kD, la longitud de la cadena peptídica de cada subunidad- $\beta$  es de 390 residuos y por su topología cada subunidad es clasificada como un plegamiento Rossmann.

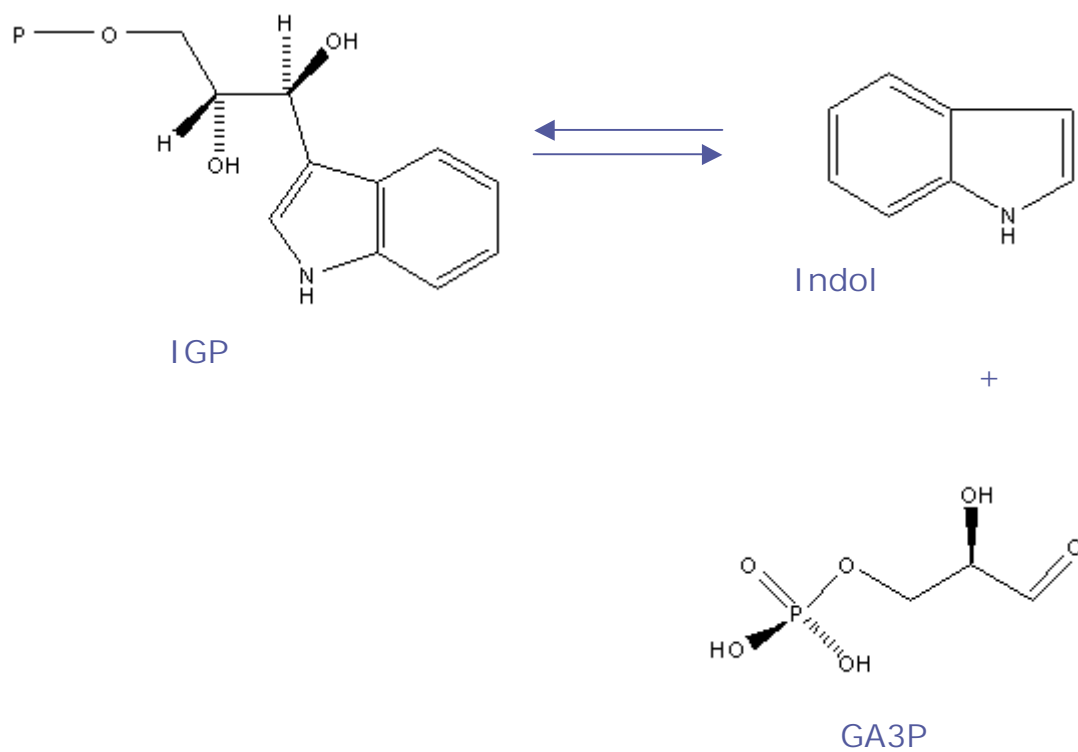
La primera estructura de la subunidad alfa de *E. coli* (*Eca*) que fue aislada, y cristalizada fue depositada en la base de datos en el año 2005 por el grupo de Yutani (Nishio, K., *et al.*, 2005) (Fig. 8). Esta ha sido la primera subunidad- $\alpha$  resuelta para un organismo mesófilo; la estructura resuelta del complejo enzimático completo que se toma como referencia es la perteneciente a la bacteria *Salmonella typhimurum* [*Sta*] con una identidad de secuencia de 85% con respecto a la subunidad alfa de *E. coli*. Es conveniente mencionar que existe una diferencia al momento de comparar la estructura de ambas subunidades alfa, especialmente alrededor de la hélice  $\alpha 2$  de *Sta*, incluyendo el aminoácido Asp60 del sitio activo, que ha sido reemplazada por una asa flexible en *Eca* (Nishio, K., *et al.* 2005., Wilmanns, M., *et al.* 1991).



**Figura 8.** Subunidad  $\alpha$  de Triptofano Sintetasa de *E. coli* (*Eca*). E.C.. 4.2.1.20; PDB 1WQ5, miembro de la familia de los Barriles TIM. En rojo:  $\alpha$  asa 6, la movilidad de esta asa genera una densidad electrónica difusa y no permite su completa resolución cristalográfica. En azul: residuo catalítico E49, y en amarillo residuo catalítico Y175. Modelo generado en PyMol. (Nishio, K., *et al.*, 2005)

La subunidad- $\alpha$  de la enzima triptofano sintetasa cataliza la ruptura reversible de indol-3-glicerol fosfato (IGP) a gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) e indol (Fig. 9). El indol migra a través de un túnel hidrofóbico hasta llegar al sitio activo de la subunidad- $\beta$ , donde se condensa con L-serina en una reacción irreversible y dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) para producir L-triptofano. El PLP está localizado en la interfase de los dos dominios de la subunidad- $\beta$  y se une a la Lys 87 en forma de aldimina interna. Durante la catálisis se ha detectado la formación de intermediarios como la aldimina externa, el  $\alpha$ -aminoacrilato y varios tipos de quinonoides. La comunicación entre las subunidades está basada en un cambio conformacional entre su forma abierta (catalíticamente inactiva) y su forma cerrada (catalíticamente activa), cambios que a su vez modulan la actividad enzimática; estas conformaciones involucran el movimiento del asa 6 de la subunidad- $\alpha$  y un dominio de la subunidad- $\beta$  llamado  $\beta$ -COMM ubicado en la hélice 6. El asa 6 (conformada por los residuos 178-192) de la subunidad  $\alpha$  es móvil y establece comunicación con el dominio  $\beta$ -COMM de la siguiente manera: La  $\beta$ Ser-178 de la hélice- $\beta$  6 forma un puente de hidrógeno con la  $\alpha$ Gly-181 del  $\alpha$ -asa 6 para constituir el túnel hidrofóbico entre las dos subunidades y estabilizar el estado cerrado de la subunidad- $\alpha$ , pero no su activación. Los datos experimentales sustentan el papel de los estados abierto y cerrado del complejo; donde el estado cerrado es la

catalíticos. La transición del estado abierto al cerrado se resume en dos puntos: i) el incremento de la actividad catalítica y ii) la comunicación alostérica entre las dos subunidades. El ligando en la subunidad- $\alpha$  interactúa directamente con el residuo  $\alpha$ -Gly-184 del asa 6, reduciendo la flexibilidad del asa y favoreciendo la formación del puente de hidrógeno entre la  $\alpha$ Gly-181 y la  $\beta$ Ser-178, así como afianzando la conformación cerrada de la subunidad- $\alpha$ . El movimiento del asa 6 repercute en el residuo  $\alpha$ Asp-60 vía el puente de hidrógeno con  $\alpha$ Thr-183. Este desplazamiento orienta a  $\alpha$ Asp-60 para la ruptura eficiente de indol-3-glicerol fosfato y a su vez permite la interacción entre el  $\alpha$  asa 2 y el dominio  $\beta$ -COMM. La importancia del residuo  $\alpha$ Gly-181 se refleja en la conservación de su posición dentro de todas las secuencias de múltiples especies que fueron analizadas, esto sugiere que la  $\alpha$ G181 es necesaria para mantener el asa 6 en su forma cerrada y posicionar correctamente al protón amida para formar el puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo del residuo  $\beta$ Ser-178 localizado en la hélice 6 de la subunidad beta (Leopoldseder, S., *et al.*, 2006. Raboni, S., *et al.* 2004).



**Figura 9.** Reacción catalizada por la enzima TrpA. Ruptura reversible del indol-3-glicerol fosfato (IGP) que genera gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) e indol.

La resolución de la estructura cristalográfica del complejo triptofano sintetasa (Nishio, K., et al. 2005) aunada a los ensayos cinéticos usando sustratos análogos, (Raushel, F., *et al.* 2003) han demostrado que si los sitios activos de ambas subunidades están ocupados por sus respectivos sustratos, el asa 6 de la subunidad alfa conformada por los aminoácidos Arg179–Asn187 toma una conformación cerrada sobre el sitio activo de esta subunidad; otro cambio conformacional ocurre al unir el sustrato a la subunidad alfa y ésta provoca un giro con respecto a la subunidad beta que comprende los residuos Gly93 y Gly189. El propósito de este giro es restringir el acceso del solvente dentro del sitio activo que está siendo ocupado. El control alostérico de la actividad de este complejo enzimático es regido por los eventos iniciados en la subunidad- $\beta$  (Nishio, K., *et al.* 2005., Raushel, F., *et al.* 2003).

## **2 EL PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS Y SU IMPORTANCIA**

Se considera, para fines prácticos, que el número de secuencias posibles es extenso, pero el número de plegamientos se reduce a una cifra manejable y, según la apreciación estadística, existen 10 000 tipos diferentes de plegamientos. Siempre ha prevalecido un interés peculiar con respecto a la relación que establece la conformación tridimensional de una proteína y la secuencia que la codifica (Koonin, E., *et al.* 2002). Actualmente, se desconoce cuál es la información en la secuencia de una proteína que determina su estructura y su función biológica.

Tal es el caso de un barril TIM que fue diseñado siguiendo el patrón de aminoácidos identificado para esta topología; pero el modelo falló cuando, en el ámbito experimental, la proteína presentó baja solubilidad, lo que hizo difícil su caracterización. Los autores, con ayuda de análisis con resonancia magnética nuclear, concluyeron haber obtenido una proteína con características similares a un barril- $(\beta\alpha)_8$ , pero sus resultados nunca se consolidaron (Tanaka, T., *et al.* 1994). Este es solo un ejemplo de los numerosos esfuerzos que se hacen por comprender las propiedades de las proteínas. Es claro que existe la correlación entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas; y debido a esto se han dirigido múltiples aproximaciones en el ámbito experimental que persiguen la predicción de las propiedades con base en la información contenida en la secuencia y cómo estas propiedades pueden ser

modificadas a partir de cambios en la secuencia con el propósito de diseñar proteínas estables y funcionales (Taverna, D., *et al.* 2002). Con respecto a la estructura de una proteína, la información es vasta; la investigación actual ahonda en el problema de plegamiento de una cadena polipeptídica y se involucra en la predicción de la función a partir de la estructura. La relación entre la estructura y la función ha emergido como una de las principales interrogantes en la biología molecular. Con base en la clasificación de proteínas, se sabe que los miembros de una familia no necesariamente catalizan el mismo tipo de reacción; y porque se advierte la presencia de los seis tipos de reacción química definidos por la Comisión de Enzimas así, un tipo de catálisis no está confinada a un plegamiento particular (Orengo, C.A., *et al.* 1999). La estructura y la función de una proteína son características que se atribuyen a la formación de una compleja red de interacciones entre aminoácidos y son el resultado de la energía libre mínima global de la cadena polipeptídica en condiciones fisiológicas (Xia, Y. and Levitt, M., 2004).

El marco teórico actual que aborda el tema de las rutas de plegamiento de proteínas es insuficiente para comprender en su totalidad este proceso; porque dada la flexibilidad estructural que posee cada uno de los residuos que conforman la cadena polipeptídica, es imposible explorar todas las conformaciones posibles en un lapso de tiempo finito (Honig, B., 1999). El estudio de las rutas que sigue una proteína de su estado no-plegado a su forma biológicamente activa ha generado diversos modelos para explicar este mecanismo (Ma, B.G., *et al.* 2007). Para abordar este complejo tema, es necesario considerar que la secuencia lineal de una proteína cuando sale del ribosoma es referida como una estructura con un alto grado de entropía que debe ser rápidamente llevada hasta su forma menos energética, o bien, a su estado plegado en un tiempo mínimo para lo cual es imposible probar todas las conformaciones posibles. Un evento importante, observado para numerosas proteínas dominio, es el llamado plegamiento co-traducciona l . El plegamiento co-traducciona l es el cambio del estado líneal a un estado de conformación tridimensional que ocurre durante la síntesis de las proteínas, y debe diferenciarse de la renaturalización (Fedorov, A. and Baldwin, T., 1997). Una proteína plegada es el estado más estable de la cadena polipeptídica, este proceso es conducido por las leyes de la termodinámica y es el resultado de interacciones entre aminoácidos que se enlazan por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, puentes salinos, fuerzas de van der Waals e interacciones dipolo-dipolo (Arnold, F. *et*

al. 2001). Aunque se sabe de la intervención de estas fuerzas para que una cadena polipeptídica adopte su conformación plegada, no se sabe con exactitud la ruta que ésta sigue para conseguirla, ya que no se sabe con precisión si el plegamiento es definido por propiedades intrínsecas de la cadena o por un proceso estocástico (Xia, Y. and Levitt, M, 2004). Uno de los modelos generados que esbozan una explicación de este fenómeno es el llamado de nucleación, este modelo plantea que en el inicio del plegamiento de una cadena polipeptídica los grupos R hidrofóbicos de los aminoácidos desplazan las moléculas de agua al exterior del centro de la proteína que se está plegando hasta alcanzar un acomodamiento de todos los grupos R de los aminoácidos que la conforman, y así, los grupos R hidrofílicos se situarán en la superficie de la proteína, mientras que los hidrofóbicos en el núcleo. Un segundo modelo, postula que el proceso de plegamiento depende de la formación de múltiples intermediarios que se pliegan de forma independiente y local, que posteriormente, guiarán el plegamiento de toda la cadena hasta alcanzar su conformación más estable (Akanuma, S. and Yamagishi, A., 2005). Actualmente, no existe una ruta consenso para definir el plegamiento de las proteínas, no obstante, en el enfoque experimental se han utilizado a las enzimas PRAI, la subunidad alfa de triptofano sintetasa e IGPS de *E. coli* como proteínas modelo para estudiar el mecanismo de plegamiento de proteínas de la familia de los barriles ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. Los avances en materia del mecanismo de plegamiento de proteínas usando estos modelos, sugieren la acumulación de, al menos, un intermediario en la reacción de plegamiento y la suma del plegamiento de fragmentos autónomos (Akanuma, S. and Yamagishi, A. 2005., Gualfetti, P., *et al.* 1999., Zitzewitz, J. and Matthews, R., 1999).

Los experimentos realizados con la subunidad alfa de triptofano sintetasa demuestran que los módulos hebra- $\beta$ -hélice- $\alpha$ -hebra- $\beta$  son esenciales para consolidar la estructura (Zitzewitz, J. and Matthews, C.R., 1999). El modelo concebido, resultado de una cinética de plegamiento para las enzimas PRAI y la subunidad alfa de triptofano sintetasa, señala que estas enzimas adoptan el llamado modelo “6+2”, éste se refiere al plegamiento inicial de los primeros seis módulos hebra- $\beta$ -hélice- $\alpha$  amino terminales y que se piensa, son una premisa de la estructura tridimensional definitiva de la proteína (Akanuma, S. and Yamagishi, A., 2005). Se especula que los residuos esenciales para el plegamiento del barril están distribuidos en la región ( $\beta/\alpha$ )<sub>3-4</sub> $\beta$ <sub>5</sub>, porque cuando la proteína se fragmenta en el segmento mencionado, ésta pierde por completo el plegamiento; pero también existe evidencia que se contrapona a esta información, ya

que con base en los resultados publicados por Saab-Rincón, G. (Saab-R., G., et al. 2005) y Soberón, X. (Soberón, X., et al. 2004), PRAI fue fragmentada en dos partes, una de ellas comprende el módulo  $(\beta\alpha)_{1-4}$ , y el segundo  $(\beta\alpha)_{5-8}$ ; estos fragmentos fueron capaces de ensamblarse para reconstituir su actividad catalítica *in vivo*; entonces, sólo los fragmentos  $(\beta\alpha)_4$  son capaces de ensamblarse —con ayuda de un cierre de leucinas que refuerza la interacción entre los fragmentos de la proteína— para reconstituir la actividad catalítica de PRAI (Soberón, X., et al. 2004). Con estos resultados, se favorece la teoría de “4+4”, tanto en el mecanismo evolutivo como en el de ruta de plegamiento; esta teoría es avalada por los estudios hechos con la enzima triosa fosfato isomerasa de músculo de pollo y conejo, empero, ello no significa que no pueden existir otras teorías que puedan explicar el mecanismo de plegamiento de otros miembros de la familia de los barriles TIM (Bertolaet, B.L. and Knowles, J.R., 1995., Pan, H., et al. 2002., Seitz, T., et al. 2007.). Para analizar la solubilidad de las proteínas recombinantes y explorar su estabilidad de plegamiento, los protocolos de biología molecular incluyen la fusión a genes reporteros.

En biología molecular se utiliza la fusión de genes que sirven como reporteros de expresión genética y localización de proteínas en el entorno celular, tanto en células eucariontes como en procariontes. Algunos de los genes que se fusionan son los que codifican para las proteínas fosfatasa alcalina (codificada por el gen *phoA*), la  $\beta$ -lactamasa (codificada por el gen *bla*), la  $\beta$ -galactosidasa, la proteína GFP, la RFP, la enzima DHFR, Luciferasa y CAT. Estos reporteros han sido de gran utilidad para caracterizar proteínas de transporte, monitoreo de expresión genética, identificación de regiones de proteína que promueven la translocación de la membrana, predicción de la topología de membrana, tráfico de proteínas, biosensores, eficiencia de promotores, plegamiento de proteínas entre otras funciones. La fusión de un reportero de plegamiento a una proteína recombinante permite evaluar, en condiciones experimentales óptimas, el correcto plegamiento de la cadena a través de la conservación de la actividad catalítica del reportero (Feilmeier, B., *et al.* 2000., Wigley, C., *et al.* 2001., Morel, N. and Massoulié, J., 2000).

Los genes que codifican para las proteínas GFP y CAT son ampliamente usados como reporteros para proteínas citoplasmáticas en los protocolos de biología molecular porque su método de análisis es sencillo y el costo de los ensayos es accesible. En el

caso de la proteína GFP, cuando ésta se fusiona al extremo carboxilo terminal de la proteína de interés (río abajo o *downstream*), el plegamiento continúa porque pertenece a una sola cadena polipeptídica; así, cuando la proteína de interés se ha plegado de manera correcta, la GFP también lo hará y fluorecerá. Este reportero ha sido uno de los más usados porque la forma monomérica activa de GFP es fácil de expresar en *E. coli* sin necesidad de utilizar sustratos específicos. Para detectar la expresión de GFP en un cultivo bacteriano, es suficiente la exposición de las células a luz UV de onda larga; GFP emite una luz verde como consecuencia de la excitación del fluoróforo interno compuesto por la posición secuencial de los residuos Ser-Tyr-Gly cercanos a la región amino terminal de la proteína. (Feilmeier, B., *et al.* 2000)

Uno de los impedimentos más frecuentes para el análisis de proteínas recombinantes es su baja solubilidad. Un método accesible que permite identificar un número importante de variantes con plegamiento estable dentro de una librería es el que usa la fusión del gene de CAT (Sieber, V. 2003). La actividad catalítica de la proteína reportera CAT tiene una correlación entre la solubilidad de las variantes obtenidas y la capacidad de *E. coli* para crecer en medio nutritivo adicionado con el antibiótico cloranfenicol; la principal ventaja de utilizar este método yace en la posibilidad de eliminar directamente las variantes que no portan un gen reportero funcional que genera la resistencia al antibiótico. Karen Maxwell desarrolló un método que utiliza a CAT como enzima reportera de solubilidad de variantes de la integrasa de HIV (Maxwell, K., *et al.* 1999). El método ayuda a discernir, *in vivo* en *E. coli*, las proteínas recombinantes solubles de aquellas insolubles; para identificar las variantes es suficiente platear el cultivo en medio con altas concentraciones del antibiótico, porque se sabe que las proteínas insolubles que han sido fusionadas a CAT exhiben una resistencia menor al antibiótico comparada con las proteínas más solubles. Este ensayo es accesible y sencillo de lograr en el laboratorio, y se ha demostrado, con base en los resultados publicados por K. Maxwell, que el método implementado permite aislar las proteínas solubles de las insolubles *in vivo* en *E. coli* usando diferentes concentraciones del antibiótico cloranfenicol. Y para integrar los resultados del ensayo se propone que utilizar un Western Blot, en el cual se analizarán las fracciones soluble e insoluble del lisado celular para identificar, con ayuda de anticuerpos, la expresión de la proteína CAT (Maxwell, K., *et al.* 1999). El monómero de la proteína CAT (E.C. 2.3.1.28; PDR 3CI A) ha sido ampliamente usada en los protocolos de Biología Molecular como



reportero de plegamiento y como marcador de resistencia al antibiótico cloranfenicol, tanto en células procariontes como eucariontes. Dentro de las consideraciones que deben tomarse, resalta el hecho de que el gene de CAT, cuando se fusiona a la proteína de interés, debe situarse río abajo del promotor de la proteína de interés. Los reportes que publican el uso de fusiones de la proteína CAT, demuestran que esta proteína reportera se pliega rápida y eficazmente en el citoplasma celular, es una proteína muy soluble, tolera temperaturas de hasta 75°C, es parcialmente activa en una disolución 8M de urea, mantiene su función catalítica cuando se fusiona a otras proteínas y el método de selección en placas de medio de cultivo adicionado con cloranfenicol es accesible y sencillo de llevar a cabo en el laboratorio (Morel, N. and Massoulié, J. 2000., Roben, J. *et al.*, 1993).

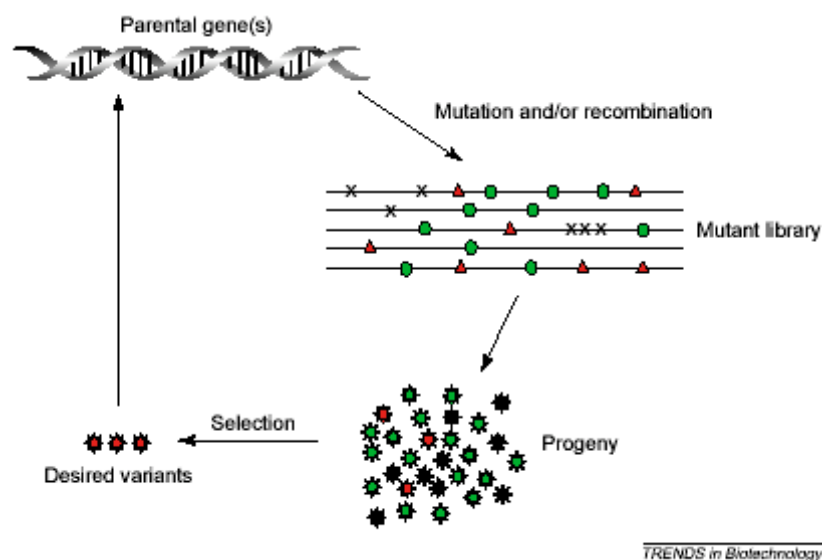
### **3.-INGENIERÍA DE PROTEÍNAS & EVOLUCIÓN DIRIGIDA**

La ingeniería de proteínas tradicionalmente se basa en el diseño racional de proteínas *in silico* y la posterior aplicación de estrategias experimentales que permitan comprobar que los modelos generados por la predicción de los algoritmos computacionales fueron acertados. Se propone que los diseños deben adecuarse a un andamiaje proteico estable, es decir, que al introducir cambios en la secuencia éste no vea comprometida su estabilidad de plegamiento en ningún momento. Esta aplicación requiere de un conocimiento profundo de la estructura y del mecanismo catalítico de la enzima (Chen, R., 2001), factores que además de haber sido limitantes en la aplicación del diseño racional de enzimas, no han garantizado el éxito (Hellings, H., *et al.* 1991., Hellings, H. and Richards, F. 1991). El reto real de la ingeniería de proteínas yace en la viabilidad de generar enzimas *de novo* capaces de reconocer un amplio espectro de sustratos, o bien, capaces de reconocer sustratos de nueva generación nunca empleados por la naturaleza pero sí de interés para la industria química (Dalby, P., 2003). Con el fin de alcanzar este ambicioso objetivo, en las pasadas dos décadas ha surgido como alternativa la evolución dirigida de proteínas. El término evolución dirigida ha sido destinado para englobar las técnicas que generan variantes de proteínas en combinación con métodos de selección o de tamizaje para identificar las características funcionales deseadas. Durante las últimas décadas la evolución dirigida de proteínas se ha convertido en la principal técnica empleada por la ingeniería de proteínas gracias al desarrollo de diversas herramientas de la biología molecular (Dalby, P., 2003).

Darwin describió, *grosso modo*, la evolución como un proceso competitivo donde intervienen la variación y la selección natural a través de ciclos iterativos de mutación y adaptación; esto a nivel molecular, es lo que da origen a la diversidad genética en los taxa. La evolución dirigida reúne los conceptos de mutación y selección aplicados en estrategias experimentales para mejorar las propiedades catalíticas de biomoléculas atractivas en los ámbitos científico e industrial. La evolución dirigida pretende imitar el proceso de evolución natural bajo las condiciones de laboratorio, y para llevar a cabo esto se han considerado dos componentes: primero, la diversidad genética, la cual es creada mediante mutagénesis; y segundo, el análisis de las librerías generadas ya sea por selección genética o determinando directamente la actividad por métodos aplicables a un formato de alta eficiencia para identificar las variantes con la función requerida. La construcción de librerías combina técnicas como mutagénesis azarosa (Bloom, J., *et al.* 2005), mutagénesis sitio-dirigida (Taylor, S., *et al.* 2001., Bloom, J. *et al.* 2005), StEP (Zhao, H., *et al.* 1998), ITCHY (Ostermeier, M., *et al.* 1999), oligonucleótidos sintéticos (Morris, J.A. and McIvor, R.S., 1994), recombinación *in vivo* (Saab-Rincón, G., *et al.* 2005) y barajeo de ADN (Stemmer, W.P. 1994). Asociado a esto es necesario contar con la tecnología que auxilie en la tarea de analizar las cientos o miles de variantes generadas dentro de una librería, tarea descomunal si tomamos en cuenta que son 20 los aminoácidos que pueden sustituir cada posición dentro de una secuencia dada; entonces: ¿Cuántas variantes esperaríamos obtener si, por ejemplo, la cadena polipeptídica tiene una longitud de 250 residuos? Y si cada residuo, uno por uno, puede sustituirse por los 20 aminoácidos conocidos, obtendríamos  $20^{250}$  variantes, Sería imposible obtener este astronómico número de variantes y mucho menos de analizarse. En realidad el número de variantes que se pueden generar es órdenes de magnitud mayor al número de mutantes que se pueden analizar a través de escrupulosos métodos de selección o de tamizaje. El uso de complementación de cepas auxótrofas para selección *in vivo* de variantes dentro de una librería, permite por lo general el análisis de librerías en el orden de  $10^5$ - $10^6$  variantes en un experimento; sin embargo se encuentra limitada a funciones que sean indispensables para el organismo utilizado en la selección. Otra desventaja es que en algunos casos se obtienen falsos positivos, por lo que cuando se han seleccionado mutantes, es necesario realizar los ensayos cinéticos y químicos para confirmar que la meta de encontrar variantes con funciones mejoradas o con funciones diferentes a la original se ha cumplido (Fig. 10).

un método sencillo, sensible (Chen, R., 2001) y de preferencia económico para poderlo aplicar en platos de ensayo en el que se pueden analizar a la vez 96 variantes. El tiempo y trabajo necesario en este caso, crece linealmente con el número de muestras que se desean analizar, pero normalmente por las mismas razones se limitan a unos cuantos miles.

Con las limitantes que imponen la selección y el tamizaje, las tendencia actual exige reducir la generación de variantes generadas combinando el diseño racional de proteínas *in silico* (Dwyer, MA., *et al.* 2004) con la aplicación de estrategias experimentales capaces de comprobar los modelos generados por los algoritmos computacionales. Y porque es casi imposible probar el extenso número de variantes que se pueden generar, es esencial diseñar una estrategia de evolución dirigida que incluya una librería de mutantes rica capaz de cubrir todas las funciones enzimáticas esperadas por el diseño (Bloom, J., *et al.* 2005). Los cambios en la secuencia desestabilizan, en múltiples casos, la estructura nativa de la proteína, y hacen imposible el reconocimiento del sustrato y, por ende, la catálisis enzimática, razón por la cual, en el diseño de los cambios en la secuencia nucleotídica, se sugiere restringir la mutagénesis a zonas que sean potencialmente relevantes para la actividad catalítica (Pelletier, J. and Lortie, R., 2007., Fox, R., *et al.*, 2007., Chica, R. *et al.*, 2005).



**Figura 10.** Esquema básico del proceso de evolución dirigida. Una mutante tomada de una librería se diferencia de su parental por los cambios ocurridos en su secuencia. Las mutaciones que porta son neutras (●), deletéreas (X) o benéficas (▲). La progenie que expresa estos genes mutantes es seleccionada siguiendo un riguroso protocolo experimental. Los genes aislados

pueden ser utilizados para un nuevo ciclo de evolución *in vitro*. Tomado de Chatterjee, R. and Yuan, L., 2006.

El diseño de enzimas que han sido probadas experimentalmente con funciones y propiedades estructurales nuevas ha generado modelos exitosos; y un ejemplo exitoso usando el plegamiento de barril TIM es el que reporta el grupo de R. Sterner, *et al* en el año 2000 y 2004; su trabajo se sustenta en la hipótesis de que enzimas de diferentes rutas metabólicas a menudo tienen mecanismos catalíticos similares y sus estructuras tridimensionales son clasificadas dentro de la misma clase. Con base en esta hipótesis, los autores eligen las enzimas HisA y TrpF de *Thermotoga maritima*, enzimas pertenecientes a las rutas de biosíntesis de histidina y triptofano, respectivamente. Estas enzimas comparten dos características fundamentales: ambas poseen un plegamiento de barril- $(\beta/\alpha)_8$  y catalizan la reacción a través de un rearrreglo de Amadori. La estrategia experimental se resume en la utilización de mutagénesis al azar y métodos de selección para generar variantes de HisA capaces de catalizar la reacción de TrpF *in vivo* e *in vitro*. La mutante El es el hallazgo de una variante que conserva una reminiscencia del mecanismo catalítico de HisA pero que es capaz de catalizar la reacción de TrpF. Las relaciones estructurales y mecanísticas comprobadas experimentalmente y diseñadas *in silico* para estos ejemplos, brindan la posibilidad de generar conocimiento sobre la relación estructura-función que puede aplicarse dentro de la ingeniería de proteínas y la evolución dirigida para inquirir actividades enzimáticas novedosas considerando otros andamiajes (Jürgens, C., *et al.* 2001., Leopoldseder, S., *et al.* 2004). El segundo ejemplo es el referido al grupo de Hak-Sung Kim: Su estrategia consiste en generar inserciones, deleciones, sustituciones y mutaciones puntuales en los sitios activos localizados en las asas de la enzima Glioxalasa II para introducir el mecanismo catalítico de la enzima  $\beta$ -lactamasa. El resultado es una enzima evolucionada que tras haber perdido su actividad catalítica original de metalohidrolasa, ahora es capaz de hidrolizar cefotaxima sin perder la estabilidad de su plegamiento. Ellos demuestran que el reemplazo de las asas que albergan los sitios catalíticos de una enzima (regiones con un alto índice de variabilidad) y la conservación del andamiaje de la proteína receptora, es una aproximación para crear nuevos miembros dentro una familia de proteínas con una función catalítica activa y novedosa (Park, H., *et al.* 2006). Este ha sido un caso exitoso donde se aplica la ingeniería de proteínas combinada con un protocolo de evolución dirigida, y que pone de manifiesto el extraordinario conocimiento de la

que este diseño experimental es un punto de partida para dirigir estrategias que permitan el intercambio de asas catalíticas y, tal vez, considerar la recombinación de genes homólogos con el objeto de buscar funciones catalíticas innovadoras (Park, H., *et al*, 2006).

Porque es casi imposible probar el número astronómico de mutantes esperadas por el diseño, es esencial contar con una estrategia que permita crear librerías ricas en proteínas que porten la función diseñada. El diseño de las librerías demanda del pleno conocimiento de la estructura y la función de la enzima, porque la predicción de los cambios estructurales que producirán las mutaciones en la proteínas no es fácil (Bloom, J., 2005).

Siguiendo una tendencia innovadora, y analizando los antecedentes que plantean algunos grupos de investigación, este proyecto de ingeniería de proteínas también aplica para su desarrollo el diseño semiracional. Con base en un análisis de secuencia y estructura, se determinó la secuencia del asa que debía translocarse; siendo así que, la secuencia del asa catalítica 6 de TrpS fue la elegida para este trabajo. Con la finalidad de buscar actividades catalíticas diferentes dentro del andamiaje de PRAI, se ha introducido variabilidad por mutagénesis a saturación en los codones 124 y 126, codones que corresponden a las última y penúltima posiciones de la hebra- $\beta$  que miran al interior del barril, y que se sabe, corresponde a la localización de los sitios activos de los barriles ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>. El protocolo, además del uso de herramientas bioinformáticas para analizar la estructura y las secuencias, utiliza estrategias de evolución dirigida, como el uso de oligonucleótidos degenerados y sistemas de tamizaje y selección; todo esto con la finalidad de incrementar la probabilidad de obtener variantes con una actividad catalítica novedosa. Cuando se cuenta con la información estructural y mecanismo catalítico, aunque no son requisitos fundamentales, ayuda a dirigir el sitio de mutación de la proteína, pero una de las bondades que caracteriza a los protocolos de evolución dirigida, es la oportunidad de prescindir de esta información para realizar la mutagénesis.

## **OBJETIVO GENERAL**

Generar un banco donde se transloque el asa 6 de la subunidad alfa de la enzima Triptofano sintetasa en la posición equivalente al asa 6 del gene de PRAI de *E. coli*, variando las dos últimas posiciones de la hebra- $\beta$  6 que apuntan al interior del barril

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Diseñar los oligonucleótidos que permitan la translocación del asa 6 de la subunidad alfa de Triptofano sintetasa dentro de la posición equivalente al asa 6 de PRAI, introduciendo variabilidad en las dos últimas posiciones de la hebra- $\beta$  6 de PRAI que apuntan hacia el interior del barril.
- Generación de la librería y su fusión a un reportero de plegamiento para cuantificar el porcentaje de proteínas viables.
- Probar el banco generado en cinco métodos de selección genética para funciones diferentes.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 1. OLIGONUCLEÓTIDOS y CONSTRUCCIÓN DEL GEN MUTANTE DE PRAI. PREPARACIÓN DE LA LIBRERÍA.

El diseño de Oligonucleótidos para translocar la secuencia correspondiente al asa 6 de la subunidad  $\alpha$  de Triptofano sintetasa en la secuencia del asa 6 de PRAI está concebido bajo la premisa de crear un método estandarizado con el cual la translocación de asas en otras posiciones sea posible sin modificar la secuencia de las mismas (Tabla 2). La síntesis de oligonucleótidos se hizo en la Unidad de Síntesis del IBT, UNAM.

Nombre	Secuencia (5'→3')
NdeIPRAI	CAG TCG CAT ATG CAG GAG GGG TGT TGA TGG TC
HindIIIAOL	AAG CGG GCA GTG AGC GCA ACG CAA TTA ATG TGA
HindIIIBiv	A TGA CAG TCC GAA GCT TCA GGA GGG GTG TTG ATG
NHL6Cod	CAG CAC GTT GAT AAA TAT NNS TTA NNT
NHL6NoCod	NN TAA SNN ATA TTT ATC AAC GTG CTG AAA CTC GCG
L6TrpSCod	TCA CGA GCA GGC GTG ACC GGC GCA GAA AAC CGC GCC GCG TTA CCC
L6TrpSNoCod	GG TAA CGC GGC GCG GTT TTC TGC GCC GGT CAC GCC TGC TCG TGA A
COL6Cod	TTT GAC TGG TCA CTA TTA AAT GGT CAA TCG CTT GCC
COL6NoCod	CGA TTG ACC ATT TAA TAG TGA CCA GTC AAA G
BamHIPRAI	T GCC GGA TCC TCA TTA ATA TGC GCG CAG CGT C
NheIAOL	CCT AAT GGT GAT GGT GAT GGT GAG TAC TAT CCA GGC

**Tabla 2.** Nombre y secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

#### 1.1 Purificación de Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos NHL6Cod, NHL6NoCod, L6TrpSCod, L6TrpSNoCod, COL6Cod y COL6NoCod se purificaron en un gel de Acrilamida 20%, 8M Urea. Las bandas visualizadas con una lámpara de mano de UV correspondiente al tamaño del oligonucleótido se cortaron y se introdujeron en un tubo Eppendorf® de 1.5 ml. Se agregó 1 ml de buffer de elusión (Sambrook, J., *et al.* 1989. SDS 0.1%, Acetato de Amonio 0.5 mM. Acetato de Magnesio 10 mM) para oligonucleótidos y se incubaron a 80°C con agitación por 4 horas. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se puso a secar en Savant hasta que el volumen se redujo a aproximadamente 200  $\mu$ l. El líquido

remanente se removió mediante extracciones con n-butanol, hasta observarse la formación de una pastilla. Se lavó con 1 ml de etanol absoluto enfriado a -20 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 14,000 rpm 10 minutos, se removió cuidadosamente el sobrenadante y se puso a secar en Savant. Finalmente, se resuspendió la pastilla con 100 µl de agua grado milliQ y se tomaron 2 ml para verificar su pureza y concentración en un gel delgado (0.75 mm) de Acrilamida 20% y Urea 8M.

#### Cuantificación de Oligonucleótidos

En una celda de cuarzo se diluyó 1 µl de oligonucleótido purificado en 599 µl de agua. Después de homogeneizar la solución se midieron las absorbancias correspondientes a 260 nm y 280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro de UV marca Beckman. La fórmula matemática para cuantificar ADN de cadena sencilla es la citada en Sambrook, et al. 1989.

#### Fosforilación de Oligonucleótidos.

Se fosforilaron 400 pmoles de los oligonucleótidos NHL6NoCod, L6TrpSCod, L6TrpSNoCod y L6COCod mediante el siguiente protocolo:

400 picomolas/ [oligonucleótido]= **X** µl de oligonucleótido a quinar,

Donde [oligonucleótido], se refiere a la concentración del oligonucleótido purificado, determinada espectrofotométricamente y expresada en picomoles/µl

El volumen final para la reacción de fosforilación fue de 100 µl :

- **X** µl de oligonucleótido purificado
- 10 µl de Buffer PNK (Polynucleotide Kinase, New England Biolabs ®)
- 15 µl ATP (10mM)
- El volumen se ajustó con agua grado milliQ
- 2 µl de Kinasa (New England Biolabs ®)

*Las reacciones se incubaron 1 hora 30 minutos a 37°C.*

*La enzima se inactivó incubando las reacciones 10 minutos a 65°C*

#### Hibridación de Oligonucleótidos



Se hibridaron las cadenas de ADN complementarias; las correspondientes al extremo amino, al asa 6 de triptofano sintetasa y al extremo carboxilo.

En un tubo Eppendorf® de 0.7 ml se mezclaron 400 picomolas de oligonucleótido Codificante y No Codificante, respectivamente fosforilados. Los tubos sellados se colocaron en un baño de agua hirviendo y se dejaron hasta que llegaron a temperatura ambiente.

### Ligación

En una primera reacción de ligación se buscó ligar la hibridación de los oligonucleótidos correspondientes al extremo amino —que debe hibridar con la región que codifica para el final de la hebra-β 6 de PRAI en el vector pDAN5-PRAI, y en este oligonucleótido degenerado se ha introducido variabilidad en las posiciones correspondientes a los residuos 124 y 126 de PRAI— con la hibridación de la secuencia que codifica para el asa 6 de Triptofano sintetasa (inserto). En una segunda reacción de ligación se buscó ligar el inserto con la hibridación del extremo carboxilo— que debe hibridar con el inicio de la hélice-α-6 de PRAI en el vector pDAN5-PRAI—.

El volumen final de la reacción de ligación fue de 98μl.

- 40 μl hibridación Inserto
- 40 μl hibridación Vector
- 10 μl Buffer Ligasa (10x) Fermentas ®
- 6μl High ATP (5x) Invitrogen ®
- 2 μl de agua grado milliQ

*Las reacciones se incubaron en un baño a 16° C toda la noche.*

### Purificación de las reacciones de ligación

Las ligaciones se purificaron en un gel nativo de Acrilamida al 10%. Después de correr el gel, éste se tiñó con bromuro de etidio y se cortó la banda del tamaño correspondiente a la ligación del extremo amino y el asa 6 de triptofano sintetasa (Ligación NHL6: 152 bp) y aquella acorde al extremo carboxilo y el asa 6 TrpS (Ligación COL6: 157 bp). Las piezas de gel se colocaron en un tubo Eppendorf® con 1 ml de buffer de elución de oligonucleótidos (Sambrook, J., *et al.*1989) y se incubaron a 65°C en agitación por 3

horas. Se continuó la purificación como se describió anteriormente para los oligonucleótidos.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para obtener el megaprimer del extremo amino (650 bp).

*Para una reacción de 100 µl*

Templado: Plásmido pDAN5-PRAI (50 ng/µl)	1 µl
Oligonucleótido HindIII AOL (25 picomolas)	1 µl
Ligación NHL6 purificada	15 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4 µl
Buffer PCR (10X)	10 µl
dNTP's (2.5 mM)	10 µl
Agua	53 µl
Enzima <i>Taq</i> polimerasa (purificada en el laboratorio)	5 µl

Las condiciones de la PCR para amplificar el extremo amino fueron: primer ciclo de desnaturalización 95°C 5 min., 32 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C, 1 min., 62°C, 1:15 min., 58°C 25 seg., 72°C 2 min y una extensión final 72°C, 10 min.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para obtener el megaprimer del extremo carboxilo (250 bp).

*Para una reacción de 100 µl*

Templado: Plásmido pDAN5-PRAI (50 ng/µl)	1 µl
Oligonucleótido NheI AOL (25 picomolas)	1 µl
Ligación COL6 purificada	15 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4 µl
Buffer PCR (10X)	10 µl
dNTP's (2.5 mM)	10 µl
Agua	53 µl
Enzima <i>Taq</i> polimerasa	5 µl

Las condiciones de la PCR para amplificar el extremo carboxilo fueron: primer ciclo de desnaturalización 95°C 5 min., 32 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C, 1 min.,

60°C, 1:30 min., 72°C, 1 min y una extensión final 72°C, 10 min. En un termociclador iCycler de Bio-Rad®.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para obtener el producto de superposición (850 bp).

Este producto de PCR fue el resultado de la extensión y amplificación de los megaprimers NHL6 y COL6. Los megaprimers comparten entre sí las 45 bp pertenecientes a la secuencia que procede del asa 6 de TrpS flanqueando la secuencia que sustituirá la secuencia correspondiente al asa 6 de PRAI. Esta reacción generó la extensión completa del gen mutante de PRAI que intercambia el asa 6 de TrpS en el asa 6 de PRAI.

*Para una reacción de 100 µl:*

PCR Megaprimer Amino (NHL6,20ng/µl)	15 µl
PCR Megaprimer Carboxilo (COL6, 20ng/µl)	15 µl
Oligonucleótido HindIII (25 picomolas)	1 µl
Oligonucleótido NheI (25 picomolas)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4 µl
Buffer PCR (10X)	10 µl
dNTP's (2.5 mM)	10 µl
Agua	34 µl
Enzima <i>Taq</i> polimerasa	5 µl

Las condiciones de la PCR de superposición fueron: primer ciclo de desnaturalización 95°C, 5 min., 30 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C, 1 min., 60°C, 1:30 min., 72°C, 1 min y una extensión final 72°C, 10 min. En el ciclo 12 se agregaron los oligonucleótidos NheI e HindIII y 2 µl más de enzima *Taq* Polimerasa.

Purificación de Megaprimers y producto de PCR de superposición

Tanto los megaprimers como el producto final se purificaron cortando la banda correspondiente de un gel de agarosa Bio-Rad® al 1% utilizando como buffer de corrida TBE —Tris-Borato-EDTA— 1x (Sambrook, J., *et al.* 1989) y el kit High Pure PCR Product Purification de Roche® para extraer el ADN del gel de agarosa. La

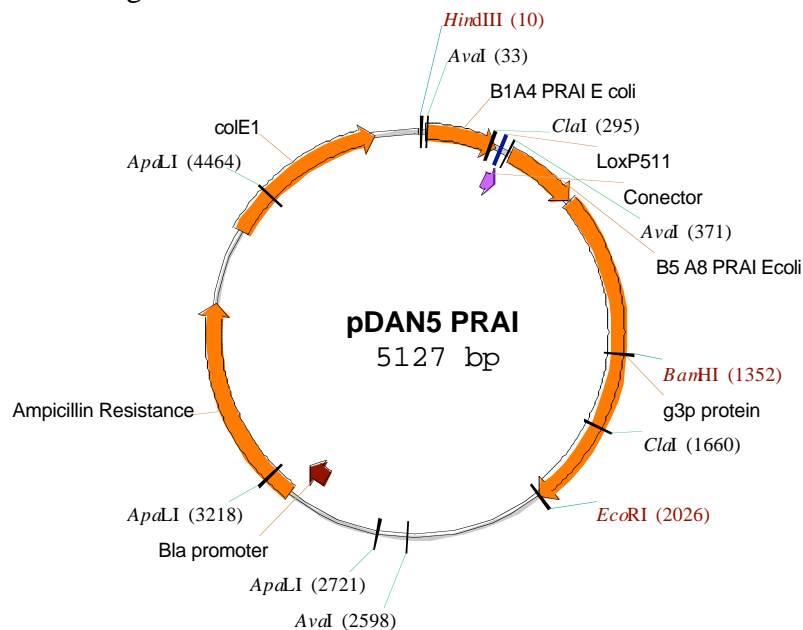
purificación de ADN, a lo largo de este trabajo, se hizo con el kit High Pure PCR Product Purification de Roche®.

Cuantificación de megaprimers, productos de PCR, vectores y reacciones de restricción.

Para cuantificar ADN de doble cadena se hizo un corrimiento electroforético de 5  $\mu$ l de cada muestra, en un gel de agarosa Bio-Rad® al 1% y utilizando como buffer de corrida TBE 1x (Sambrook, J., *et al.* 1989). Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio para observarlo en un Eagle-Eye marca Stratagene y hacer una relación de nanogramos observados por el volumen de muestra corrida.

## 2. VECTOR pDAN5-PRAI

En este trabajo se utilizó el vector pDAN5-PRAI (Saab-Rincón, *et al.* 2005) (Fig. 11). Este vector porta el gene que codifica para  $\beta$ -lactamasa (Bla) y que confiere resistencia a ampicilina. Una versión modificada de la secuencia que codifica para la proteína PRAI fue clonada bajo un promotor *lac*. A ésta versión de PRAI se le introdujo un sitio cre-lox en la secuencia que codifica para el asa que une la hélice- $\alpha$  4 a la hebra- $\beta$  5. El sitio cre-lox es reconocido por la recombinasa cre-lox, y cuando se transforma en una cepa que expresa la enzima recombinasa es posible llevar a cabo la recombinación *in vivo* entre mitades del gene.



**Figura 11.** Vector pDAN5-PRAI. Saab-Rincón, *et al.* 2005

## 2.1 Purificación de los vectores pDAN5-PRAI y pDAN5-PRAICAT

Se tomó una colonia aislada de una caja de medio Luria-Bertani (LB) adicionada con ampicilina (Amp) y se inoculó en 20 ml de medio de cultivo LB líquido y 20  $\mu$ l de ampicilina (200 mg/ml: Stock 1000x). Se incubó a 37°C, 12 horas en agitación. Por centrifugación se recolectaron las células y se purificó el plásmido usando el kit High Pure Plasmid Purification Isolation de Roche®. La concentración final de vector pDAN5-PRAI fue de 100 ng/ $\mu$ l y la concentración del vector pDAN5-PRAICAT fue de 90 ng/ $\mu$ l.

## 2.2 Reacción de restricción doble del vector pDAN5-PRAI con las enzimas de restricción HindIII y NheI (New England Biolabs®)

El vector pDAN5-PRAI se sometió a una reacción de restricción con las enzimas HindIII y NheI, enzimas que generan extremos romos compatibles con la digestión del producto de PCR de superposición. La reacción de restricción doble del vector se llevó a cabo en un volumen final de 80  $\mu$ l, para la cual se adicionó el volumen necesario de vector purificado correspondiente a 1.5  $\mu$ g, 8  $\mu$ l de Buffer 2 de New England Biolabs® (10x), 0.8  $\mu$ l de BSA (100x), 1.5  $\mu$ l de cada enzima de restricción y se completó el volumen con agua para tener un volumen final de 80  $\mu$ l. Se prepararon 6 tubos de reacción y se incubaron 10 horas a 37°C. Cuando este tiempo hubo transcurrido se agregó a cada tubo 1.5  $\mu$ l de enzima de restricción MluI (New England Biolabs®). La enzima MluI reconoce y corta un sitio único dentro del vector: la secuencia que codifica para el asa 6 de PRAI. La adición de esta enzima a la reacción se hizo con la finalidad de incrementar la eficiencia de digestión doble y reducir la probabilidad de encontrar vector silvestre en las clonas seleccionadas.

La digestión se purificó cortando la banda de 4 447 bp a partir de un corrimiento electroforético en un gel de agarosa (Bio-Rad®) al 1% y utilizando como Buffer de corrida TBE 1x (Sambrook, 1989). La extracción de ADN se hizo con el kit High PCR Purification Isolation de Roche®. La concentración final del plásmido digerido fue de 150 ng/ $\mu$ l

## 2.3 Digestión de producto de PCR de Superposición con las enzimas de restricción HindIII y NheI (New England Biolabs®).

El producto de la reacción de extensión de primer por PCR que tiene un tamaño de 850 bp fue sometido a una reacción de doble digestión con las enzimas HindIII y NheI para ser clonado en el vector pDAN5-PRAI.

Las reacciones se llevaron a un volumen final de 80 µl. Se pusieron a digerir 1.5 µg de producto de PCR, se añadieron 8 µl de Buffer 2 (10x), 0.8 µl de BSA (100x), 1.5 µl de cada enzima de restricción y se completó el volumen con agua a 80 µl. Se prepararon 3 tubos de reacción y se incubaron 10 horas a 37°C.

La digestión se purificó como se hizo para el vector pDAN5-PRAI, se cortó la banda correspondiente al tamaño de 650 bp y se extrajo el ADN usando el kit High PCR Purification Isolation de Roche®. La concentración final de PCR de superposición digerida fue de 100 ng/µl.

#### 2.4 Ligación y Electroporación

La relación molar de inserto: vector fue de 4:1, respectivamente. Se corrió un control negativo de esta reacción para asegurar la eficiencia de la digestión del vector, el cual no debe recircularizarse en ausencia de inserto.

Las reacciones se llevaron a un volumen final de 100 µl con la enzima ligasa y buffer ligasa de Fermentas®, High ATP (5x) de Invitrogen® y agua grado milliQ. Se incubaron a 16°C por 18 horas.

Para eliminar la alta concentración de las sales del buffer, las reacciones de ligación se purificaron por precipitación con n-butanol y se resuspendieron en 12 µl de agua grado milliQ.

Se electroporaron 4 µl de cada una de las muestras de DNA: 1) de la ligación que tiene translocada el asa 6 de Trps en el asa 6 de PRAI, 2) control negativo, plásmido no recircularizado y 3) control positivo, plásmido superenrollado: vector pDAN5-PRAI, en 50 µl de células electrocompetentes XL1-Blue usando celdas de 0.1 cm y un electroporador Gene Pulser, todos ellos de Bio-Rad ®. Cada transformación se recuperó en 980 µl de medio SOC, 10 µl de glucosa y 10 µl de MgCl<sub>2</sub> a 37°C en agitación por 1 hora.

Se plaquearon 10 µl, 50 µl y 100 µl del cultivo celular recuperado en cajas de medio LB sólido adicionado con ampicilina (200 mg/ml: Stock 1000x) y se incubaron a 30 °C por 9 horas. El objetivo de platear estos volúmenes fue cuantificar la eficiencia del banco obtenido. El cultivo restante se creció en 10 ml de medio LB líquido con ampicilina a 30 °C en agitación.

Transcurridas las 9 horas, de la caja plateada con 100 µl de cultivo del banco se tomaron 23 colonias al azar y se crecieron en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina. Se purificó plásmido de cada cultivo con el kit High Pure Plasmid Purification Isolation de Roche®.

Las colonias restantes que conforman el banco, se recuperaron de la caja con medio LB líquido con ampicilina y se llevó a un volumen total de 10 ml. Se incubó a 30°C en agitación por 20 horas. La extracción de plásmido se hizo con el kit High Pure Plasmid Purification Isolation de Roche®.

### 3.-VECTOR pDAN5-PRAICAT

Este vector fue construido por Adrián Ochoa L. en el Laboratorio del Dr. X. Soberón, es un vector derivado de pDAN5-PRAI y la característica adicional es la fusión del gen que codifica para la proteína CAT, la cual está localizada río abajo del gene que codifica para PRAI silvestre. En este nuevo vector, CAT brinda resistencia a cloranfenicol y, para nuestros fines, la fusión de esta proteína reporta el plegamiento del banco de mutantes del asa 6 de PRAI.

### 4.- SUBCLONACIÓN DEL BANCO DEL ASA 6 DE TrpS EN EL VECTOR pDAN5-PRAICAT

En el presente trabajo se utiliza el gen reportero CAT. CAT se ha fusionado en el extremo carboxilo terminal de la proteína PRAI clonada en el vector pDAN5-PRAI. Este ensayo de plegamiento ha sido diseñado para analizar la estabilidad de plegamiento del banco de mutantes del asa 6 de PRAI. La estabilidad de plegamiento del banco de mutantes se determinó plateando el cultivo en placas de medio LB adicionado con ampicilina (200 mg/ml: Stock 1000x ) y 20 mg/ml en el medio de cloranfenicol. Si la proteína PRAI mutante se plegó de forma correcta, el reportero CAT también lo hará.

4.1. Reacciones de PCR para subclonar el banco de mutantes del asa 6 de TrpS en el vector pDAN5-PRAICAT (654 bp).

*Para reacciones de 100µl*

PCR de superposición 850 bp (20 ng/µl)	3 µl
Oligonucleótido BamHIs/stop (25 picomolas)	1 µl
Oligonucleótido HindIIIBiv (25 picomolas)	1 µl
Buffer (10X)	10 µl
dNTP's (2.5 mM)	10 µl
Agua	66 µl
Enzima <i>Pfu</i> polimerasa	5 µl

Las condiciones de la reacción de PCR para subclonar fueron: primer ciclo de desnaturalización 95°C 5 min., 30 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C 1 min., 60°C 1 min., 72°C 2 min y una extensión final 72°C 10 min. En un termociclador iCycler de Bio-Rad®. Cada una de las reacciones se purificó cortando la banda de un gel de agarosa correspondiente a 654 bp y utilizando el kit High Pure PCR Product Purification by Roche®. La concentración final del producto de PCR para subclonar en el vector pDAN5-PRAICAT fue de 100 ng/µl.

4.2 Reacción de restricción doble del vector pDAN5-PRAICAT con las enzimas de restricción HindIII (New England Biolabs®) y BamHI (Fermentas®)

En esta reacción de restricción se utilizaron las enzimas HindIII y BamHI. Se pusieron a digerir en 5 tubos el volumen correspondiente a 1.5 µg de ADN. La reacción de digestión se hizo secuencial: en un primer paso, el vector se digirió 5 horas a 37°C con 1.5µl enzima BamHI, 8µl de buffer único(10x) y 0.8 µl de BSA (100x). Para eliminar las sales del buffer anterior, el ADN se purificó usando columnas y soluciones del kit High Pure PCR Product Purification by Roche®. Para digerir con la segunda enzima de restricción, HindIII, se adicionó el mismo volumen de buffer 2, enzima HindIII y BSA como el utilizado para la enzima BamHI, y se llevó el volumen final a 80 µl con agua grado milliQ. Se incubaron 6 horas a 37°C. La extracción de ADN digerido se hizo cortando la banda de un gel de agarosa del tamaño correspondiente a 5,166 bp. La concentración final de vector digerido fue de 90 ng/µl.



#### 4.3 Reacción de restricción doble del producto de PCR para subclonar usando las enzimas de restricción HindIII (New England Biolabs®) y BamHI (Fermentas®)

El producto de la reacción de PCR para subclonar en el vector pDAN5-PRAICAT fue sometido a una reacción de restricción secuencial usando, en primer lugar, la enzima BamHI. Se pusieron a digerir 1.5 µg de producto de PCR, se añadieron 8 µl de Buffer 2 (10x), 0.8 µl de BSA (100x), 1.5 µl de enzima de restricción BamHI, y se completó el volumen con agua a 80 µl. Se prepararon 4 tubos de reacción y se incubaron 6 horas a 37°C. Para digerir el ADN con la segunda enzima de restricción, HindIII, cada muestra se purificó usando el kit High PCR Purification Isolation de Roche®. Para digerir con la segunda enzima de restricción, HindIII, se adicionó el mismo volumen de buffer 2, enzima HindIII y BSA como el utilizado para la enzima BamHI, y se llevó el volumen final a 80 µl con agua grado milliQ. Se incubaron 6 horas a 37°C. La extracción de ADN digerido se hizo con el kit High PCR Purification Isolation de Roche®. La concentración final de inserto digerido fue de 100 ng/µl.

#### 4.4 Ligación para subclonar el banco del asa 6 de TrpS en el vector pDAN5-PRAICAT

La relación molar de inserto: vector fue de 8:1, respectivamente. Se corrió un control negativo de esta reacción para asegurar la eficiencia de la digestión del vector, el cual no debe recircularizarse en ausencia de inserto.

Las reacciones de ligación utilizaron el volumen correspondiente de ADN, 1.5 µl de enzima T4 DNA ligasa de New England Biolabs® y 7 µl buffer ligasa de Fermentas®, el volumen final fue llevado a 70 µl con agua grado milliQ. Se incubaron a 16°C, 12 horas.

Para eliminar la alta concentración de las sales del buffer, las reacciones de ligación se purificaron por precipitación con n-butanol y se resuspendieron con 6 µl de agua grado milliQ.

Se electroporaron 3 µl de cada una de las muestras de ADN: i) Subclonación del banco del asa 6 de TrpS, ii) Control negativo o plásmido no re-circularizado y iii) Control positivo o plásmido superenrollado pDAN5-PRAICAT, en 50 µl de células electrocompetentes XL1-Blue, usando celdas de 0.1 cm y un electroporador Gene Pulser, todos ellos de Bio-Rad®. Cada transformación se recuperó en 980 µl de medio SOC, 10 µl de glucosa y 10 µl de MgCl<sub>2</sub> a 37°C en agitación, 1 hora.

Se plaquearon 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l de cultivo celular recuperado en cajas de medio LB sólido adicionado con ampicilina (200 mg/ml: Stock 1000x ) y 20 mg/ml de cloranfenicol; también se plaquearon estos volúmenes de cultivo celular en cajas de medio LB sólido adicionado con ampicilina. El cultivo recuperado restante se distribuyó en los dos tipos de cajas. Se incubaron a 30°C, 9 a 16 horas.

De la caja con medio LB y ampicilina se tomaron 4 colonias al azar pertenecientes a la subclonación del banco del asa 6 de TrpS, y se crecieron para sobreexpresar proteína y analizar cada una de sus fracciones celulares en un gel de poliacrilamida-SDS. También se tomó una fracción del cultivo para extraer plásmido usando el kit High Pure Plasmid Purification Isolation de Roche®.

#### 5.- INDUCCIÓN y SOBREENPRESIÓN de PROTEÍNA

Se tomaron 3 colonias crecidas en la caja de medio LB-ampicilina, provenientes de la subclonación del banco del asa 6 de TrpS en el vector pDAN5-PRAICAT, y se crecieron en 14 ml de medio LB líquido a 37° C en agitación hasta obtener una OD<sub>600</sub> de 0.4. Se tomaron 7 ml de cada cultivo, de tal forma que la mitad del cultivo original se indujo con 0.25 mM de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) y la otra mitad no se indujo. Cada muestra se incubó 10 horas a 20° C en agitación.

Se tomaron 3 ml de cada cultivo y se centrifugó en tubos Eppendorf® 3 minutos a 14 000 rpm. El medio nutritivo se removió en su totalidad y la pastilla se resuspendió con 400  $\mu$ l de PBS (Sambrook, J., *et al.* 1989). Cada cultivo se lisó por sonicación (Branson Sonifier 450, 10 segundos pulso 5, 0°C). Las muestras sonicadas se centrifugaron 5 minutos a 13 000 rpm, 4°C. Las fracciones soluble e insoluble fueron separadas. La fracción insoluble —pastilla— se resuspendió con 300  $\mu$ l de PBS y 100  $\mu$ l de SDS 10% (Sambrook, J., *et al.* 1989), se vortexeó y se calentó 5 minutos a 88° C.

#### 6.- SDS-PAGE. ANÁLISIS de SOLUBILIDAD de PROTEÍNA.

Se tomaron 10  $\mu$ l de cada fracción soluble e insoluble de los cultivos inducidos y sin inducir y 10  $\mu$ l de buffer de carga para proteína (Gel loading Buffer 4x, Sambrook, J., *et al.* 1989) para hacer un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida 10%-SDS a 30mA constantes y utilizando como buffer de corrida Tris- Glycine 10x (Sambrook, J., *et al.* 1989). La tinción de las bandas se hizo con azul de Coomassie (Sambrook, J., *et al.* 1989), y para desteñirlo se utilizó la disolución desteñidora (Sambrook, J., *et al.* 1989).

7.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE LAS CEPAS: XL1-Blue, JM101::cicatrizΔtrpF, JM101::cicatrizΔthiE, JM101:VR101:ΔTIM, JM101::cicatrizΔhisA.

*Todo en condiciones estériles.*

Cada una de las cepas se estrió en una placa de medio LB y se incubó 10 horas a 37°C.

Se tomó una colonia aislada para crecer un pre-inóculo en 100 ml de medio YENB (Bacto yeast extract [0.75%], Bacto Nutrient Broth [0.8%]; Difco Laboratories®) a 37°C en agitación, toda la noche.

Con el pre-inóculo se inocularon 500 ml de medio YENB y se incubó a 30°C en agitación hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.8. Cuando se alcanzó la OD<sub>600</sub> esperada, las células se refrigeraron 5 minutos y, posteriormente, se centrifugaron a 4 000g por 10 minutos a 4°C.

Se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron con 10 ml de glicerol al 10% frío y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Este paso se repitió dos veces más. Finalmente, las células se resuspendieron en 1.5 ml de glicerol al 10% frío y se tomaron alícuotas de 50 µl que se guardaron a -70°C, hasta el momento de ser utilizadas.

## 8.- EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO

La extracción de todos los plásmidos de este trabajo se hizo con el kit High Pure Plasmid Purification Isolation de Roche®.

## 9.- SECUENCIACIÓN

Todas las secuencias de ADN analizadas en este trabajo fueron verificadas por secuenciación. La secuenciación se hizo en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

10.- COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA DE LAS CEPAS AUXÓTROFAS: JM101::cicatrizΔtrpF, JM101::cicatrizΔthiE, JM101:VR101:Δtpi, JM101::cicatrizΔhisA y CB149:ΔABCDE usando el banco del asa 6 de Triptofano Sintetasa

Las cepas utilizadas en los ensayos de complementación son las siguientes:

- JM101::cicatrizΔtrpF (Lab. Dr. X. Soberón)
- JM101::cicatrizΔthiE (Lab. Dr. X. Soberón. Biol. Filiberto Sánchez)

- JM101:VR101: $\Delta$ TIM (Saab-Rincón, *et al.* 2001)
- JM101::cicatriz $\Delta$ hisA (Lab. Dr. X. Soberón)

Los vectores ocupados como controles positivos son:

- PDAN5-PRAICAT (vector construido por Adrián Ochoa, Lab. Dr. X. Soberón)
- puc18-ThiE. (Lab. Dr. E. Morett)
- puc18-monoTIM (Saab-Rincón, *et al.* 2001)
- pGEX-HisA (Dr. Francisco Barona G.)

Se electroporaron 4 $\mu$ l de plásmido superenrollado [120 ng/ $\mu$ l] del banco de asa 6 de TrpS en una alícuota de 50 $\mu$ l de células electrocompetentes de cada cepa auxótrofa. Las cepas transformadas con el banco del asa 6 de TrpS, así como los controles positivos (cepa transformada con el vector que tiene clonado el gen silvestre que complementa la función de la cepa auxótrofa) y negativos (cepa sin transformar) se recuperaron en SOC adicionado con glucosa y MgCl<sub>2</sub>. Cada muestra se incubó por 1 hora 20 minutos a 37° C en agitación. Cada cultivo se centrifugó a 3,000 rpm durante 3 min, se retiró todo el medio nutritivo y las células se lavaron tres veces con medio mínimo o con PBS 1x —Buffer de Fosfatos— (Sambrook, J., *et al.* 1989) para asegurar la completa remoción de medio nutritivo. La pastilla final se resuspendió en 1 ml de PBS 1x.

Se platearon réplicas de 3  $\mu$ l y 6  $\mu$ l de cultivo lavado tanto en placas de medio LB y LB/ampicilina, así como en medio mínimo con y sin Difco® Casaminoácidos y ampicilina según los requerimientos del método de selección a probar. Se incubaron a 30° C, el tiempo de incubación óptimo para observar el crecimiento de colonias varía con la cepa el cual puede ser toda la noche y hasta 120 horas.

Se electroporaron 4 $\mu$ l de plásmido superenrollado [120 ng/ $\mu$ l] del banco de asa 6 de TrpS en una alícuota de 50 $\mu$ l de células electrocompetentes de cada cepa auxótrofa. Las cepas transformadas con el banco del asa 6 de TrpS, así como los controles positivos (cepa transformada con el vector que tiene clonado el gen silvestre que complementa la función de la cepa auxótrofa) y negativos (cepa sin transformar) se recuperaron en SOC adicionado con glucosa y MgCl<sub>2</sub>. Cada muestra se incubó por 1 hora 20 minutos a 37° C en agitación. Cada cultivo se centrifugó a 3,000 rpm durante 3 min, se retiró todo el medio nutritivo y las células se lavaron tres veces con medio mínimo o con PBS 1x —Buffer de Fosfatos— (Sambrook, J., *et al.* 1989) para asegurar

la completa remoción de medio nutritivo. La pastilla final se resuspendió en 1 ml de PBS 1x.

Se platearon réplicas de 3  $\mu$ l y 6  $\mu$ l de cultivo lavado tanto en placas de medio LB y LB/ampicilina, así como en medio mínimo con y sin Difco® Casaminoácidos y ampicilina según los requerimientos del método de selección a probar. Se incubaron a 30° C, el tiempo de incubación óptimo para observar el crecimiento de colonias varía con la cepa el cual puede ser toda la noche y hasta 120 horas.

- Para la complementación genética de la cepa JM101::cicatriz $\Delta$ thiE, las placas de medio mínimo no deben contener Tiamina —vitamina B1—.

#### 10.1 Re-transformación de plásmidos seleccionados. Diluciones.

Los plásmidos seleccionados fueron electrotransformados usando las cepas auxótrofas correspondientes. Tanto los plásmidos seleccionados como el control positivo (cepa transformada con el vector que tiene el gen silvestre que complementa la función de la cepa) y el control negativo (cepa sin transformar) se recuperaron en 2 ml de medio SOC adicionado con glucosa y MgCl<sub>2</sub> por 1 hora 30 minutos a 37°C en agitación. Se midió la OD<sub>600</sub>, en un espectrofotómetro Spectronic<sup>R</sup> 20 Genesys<sup>TM</sup>, para calcular el número de células y normalizar el cultivo de tal manera que en un mililitro de cultivo el número de células fuera igual a 1x10<sup>9</sup>. Las células se lavaron 3 veces con medio mínimo o con PBS 1x y la pastilla final se resuspendió en 1 ml de PBS 1x. Se hicieron diluciones de 1:100 y hasta 1:1 000 000. Se tomaron 5 $\mu$ l de cada dilución y se colocó la gota en placas de medio mínimo con y sin Difco® Casaminoácidos y una réplica en placas de medio LB y LB adicionado con ampicilina. Se incubaron a 30° C por 84 horas.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 1. Diseño de Oligonucleótidos

Un objetivo del proyecto global es la búsqueda de nuevas funciones catalíticas utilizando el andamiaje de PRAI y translocando 13 asas catalíticas pertenecientes a 8 miembros de la familia de los barriles ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>.

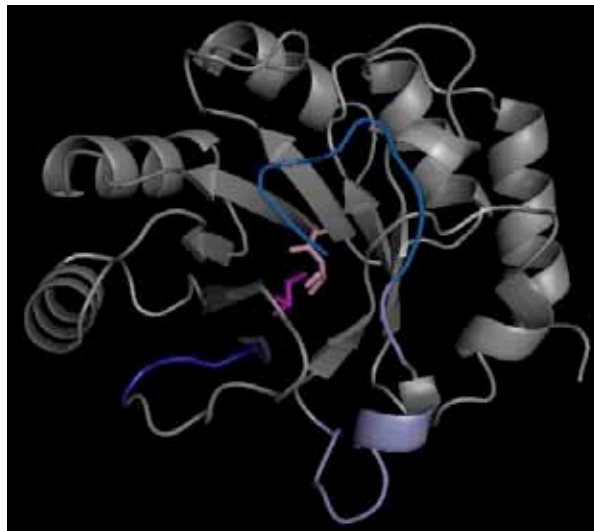
El diseño de los oligonucleótidos usados en este trabajo contempla la translocación de la secuencia del asa 6 de la enzima triptofano sintetasa en el asa 6 de PRAI, y otras secuencias homólogas, usando una estrategia experimental estandarizada para el proyecto global del laboratorio. Los oligonucleótidos HindIII<sub>AOL</sub> y NheI<sub>AOL</sub> reconocen secuencias en el templado —vector pDAN5-PRAI— y que flanquean el gene de PRAI dentro del vector. El oligonucleótido HindIII<sub>AOL</sub> reconoce una región localizada 157 bp antes del sitio de corte de la enzima de restricción cuando por PCR se amplifica el gene de PRAI utilizando como templado el vector pDAN5-PRAI; mientras que el oligonucleótido NheI<sub>AOL</sub> amplifica la región 61 bp río debajo de la secuencia que reconoce la enzima NheI. Cuando se amplifica por PCR el gene de PRAI mutante se obtiene un tamaño de 850 bp, tamaño que tiene 200 bp de diferencia con respecto a los 650 bp del gene de PRAI silvestre clonado originalmente en el vector. La ventaja de obtener un producto de 850 bp es la facilidad de establecer una diferencia de tamaño, observable en un gel de Agarosa 1%, cuando el producto de PCR se somete a una reacción de restricción doble usando las enzimas HindIII y NheI. Los oligonucleótidos utilizados para subclonar el banco de mutantes de PRAI no brindan la cualidad de análisis como lo establecido para los oligonucleótidos HindIII<sub>AOL</sub> y NheI<sub>AOL</sub>, se limitan a extender un producto de 670 bp aproximadamente.

Para elegir las secuencias catalíticas de las ocho enzimas que conforman el proyecto se trataron de elegir enzimas que fueran monoméricas o, en su defecto, que el sitio de oligomerización no estuviera sobre la cara catalítica, que comprendieran diferentes tipos de reacciones y que involucraran sustratos fosforilados como no fosforilados de la familia de Barriles TIM

Este trabajo es sólo una contribución para el proyecto en el que participan otros elementos del laboratorio. El presente trabajo se enfoca en la translocación de la secuencia del asa 6 de la subunidad alfa de triptofano sintetasa en el asa 6 de la proteína

PRAI. En el diseño se contempla la exploración del espacio de secuencia para dos posiciones que apuntan al interior del barril y que se localizan en la región carboxilo terminal del conector amino —hebra- $\beta$  6— y que se antepone al asa intercambiada. Las posiciones sometidas a mutación corresponden, como se ha visto, a los residuos involucrados en la catálisis enzimática y en la unión al sustrato. Con este diseño se incrementa la probabilidad de hallar una variante novedosa.

La traducción del oligonucleótido conector amino para el asa 6 revela que el codón degenerado **NNS** sustituye al residuo Valina (V124) en PRAI silvestre, mientras que el codón **NNT** sustituye al residuo catalítico ácido aspártico (D126) (Höcker *et al.*, 2001); de tal manera que la actividad catalítica de PRAI se verá interrumpida por la mutagénesis generada en la posición del aminoácido D126 (Fig. 12).



**Figura 12.** Proteína PRAI. En azul intenso se muestra la estructura secundaria perteneciente al conector amino, en azul claro el asa 6 de PRAI, en magenta el residuo V124 (**NNS**), en rosa el residuo catalítico D126 (**NNT**) y en violeta la estructura secundaria perteneciente al conector carboxilo. Modelo generado en PyMol.

El asa 6 de PRAI silvestre tiene una longitud de 9 aminoácidos (**NGQGGSGQR**) y la secuencia translocada del asa 6 de TrpS $\alpha$  tiene una longitud de 15 aminoácidos (**SRAGVTGAENRAALP**). Los aminoácidos sustituidos en la secuencia del asa 6 de PRAI son, en su mayoría, residuos con grupos R polares, característica intrínseca factible de suponer porque los aminoácidos que forman la superficie de la proteína tienen grupos R polares que facilitan la solubilidad de la proteína en el citoplasma

celular. Las asas, en su conformación nativa, forman una tapa flexible que se coloca sobre la cavidad catalítica de estas enzimas que permite el acomodo correcto del sustrato para la catálisis. Se espera que la translocación del asa 6 de la subunidad alfa de TrpS en PRAI silvestre, cause sólo cambios menores en la conformación tridimensional de la proteína debido a que esta asa es flexible y muestra poca interacción con el resto de la estructura, razón por la cual existe un gran interés en probar la estabilidad de un andamiaje cuando se le ha sometido a cambios drásticos en su secuencia. El estudio referente al mecanismo de plegamiento del banco de mutantes es un rubro que no compete a este trabajo; pero sí concierne estimar, utilizando a CAT como reportero de plegamiento, el porcentaje de mutantes que se pliegan en presencia de cloranfenicol.

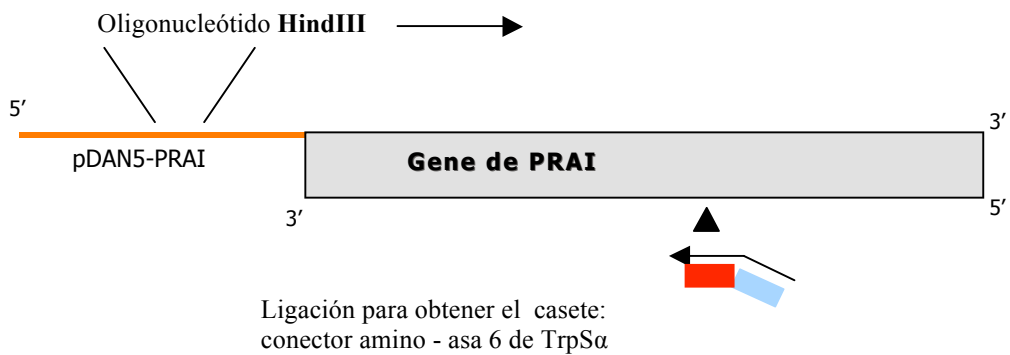
## 2. Banco de Mutantes del asa 6 de la subunidad alfa de Triptofano Sintetasa

La obtención del banco de mutantes del asa 6 de PRAI se construyó siguiendo la estrategia experimental instaurada en el laboratorio para este proyecto; la cual parte de la purificación, fosforilación e hibridación de los oligonucleótidos complementarios. Posteriormente, se hizo la ligación del conector amino con el casete que contiene la secuencia del asa 6 de TrpS $\alpha$  (Fig. 15) y la ligación del casete del asa 6 de TrpS $\alpha$  con el conector carboxilo (Fig. 15). Los oligonucleótidos que flanquean el gene se utilizaron en combinación con el producto de cada una de estas ligaciones (Fig. 13) como primers para extender por reacción de PCR dos regiones, utilizando como templado el vector p $\Delta$ n5-PRAICreLox: **1**) la región 5' del gene se extendió usando el oligonucleótido que híbrida en el sitio de restricción HindIII y la ligación del casete que contiene el conector amino; el producto de esta reacción fue de 650 bp (Fig. 13), y la reacción **2**) que extendió la región 3' del gene, en la cual se utilizó el oligonucleótido que híbrida en el sitio de restricción NheI y el tamaño de su producto fue de 250 bp (Fig. 13). Los productos de estas reacciones sobrelapan exclusivamente en la nueva asa 6 introducida, por lo que su extensión, sin el uso de templado, en una tercera reacción de PCR, permite la generación del gene de PRAI con el asa 6 intercambiada (Fig. 14) flanqueado por los sitios de restricción HindIII y NheI (Fig. 14). Los productos de PCR obtenidos se muestran en las figuras 16 y 17.



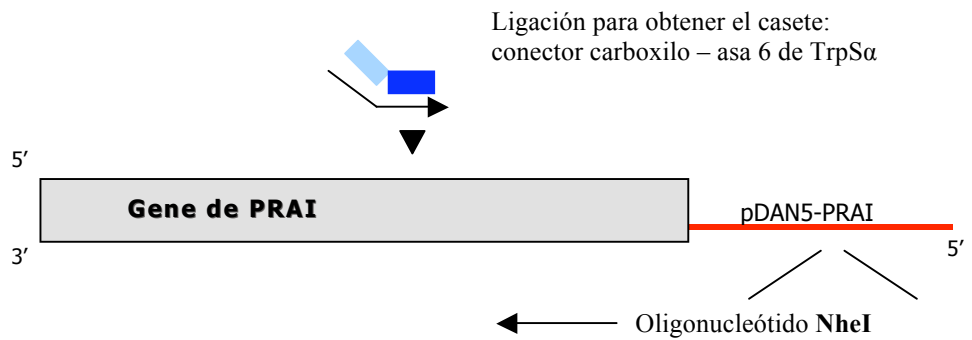
## PCR

1)

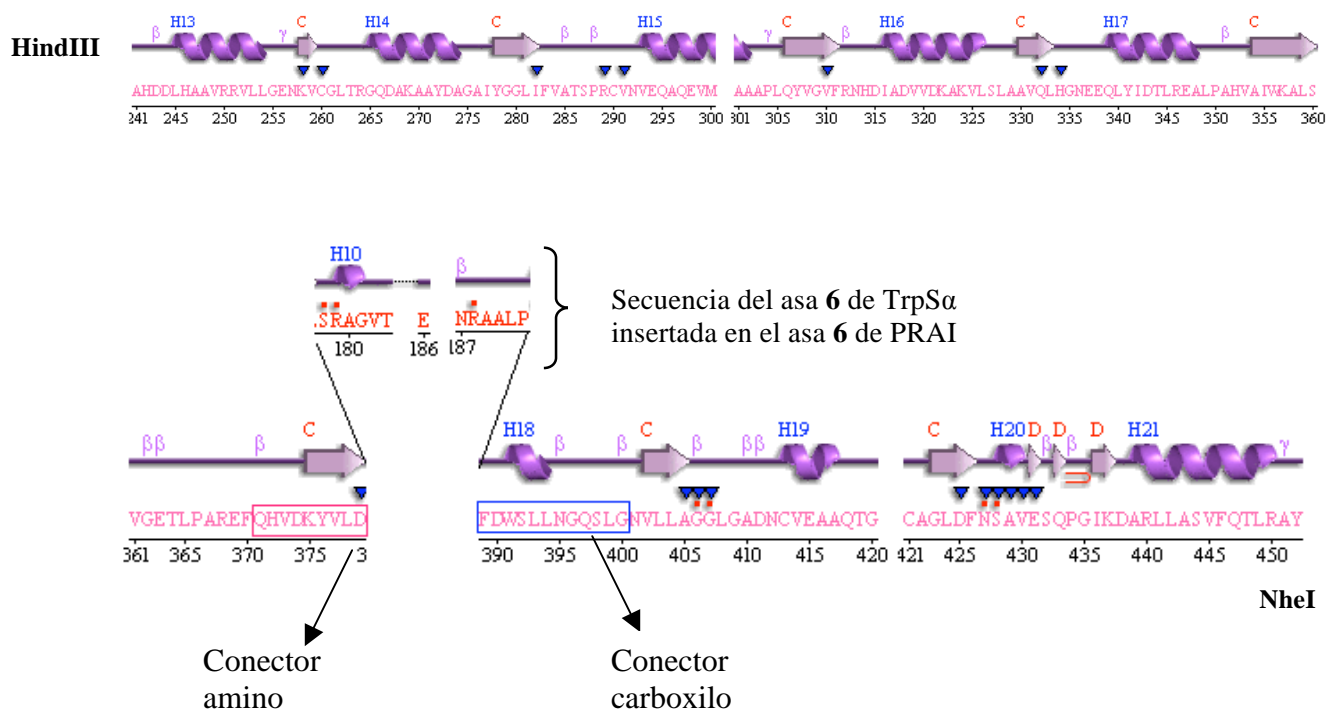


## PCR

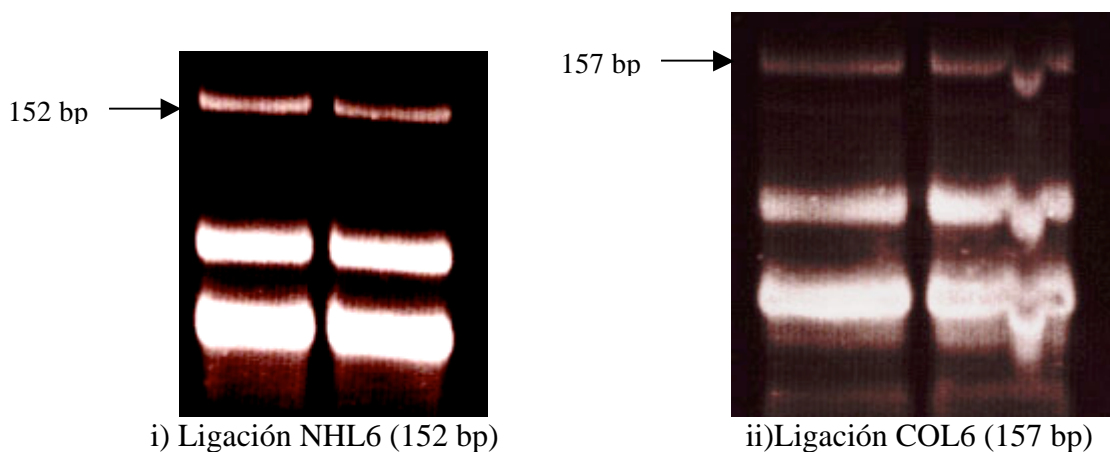
2)



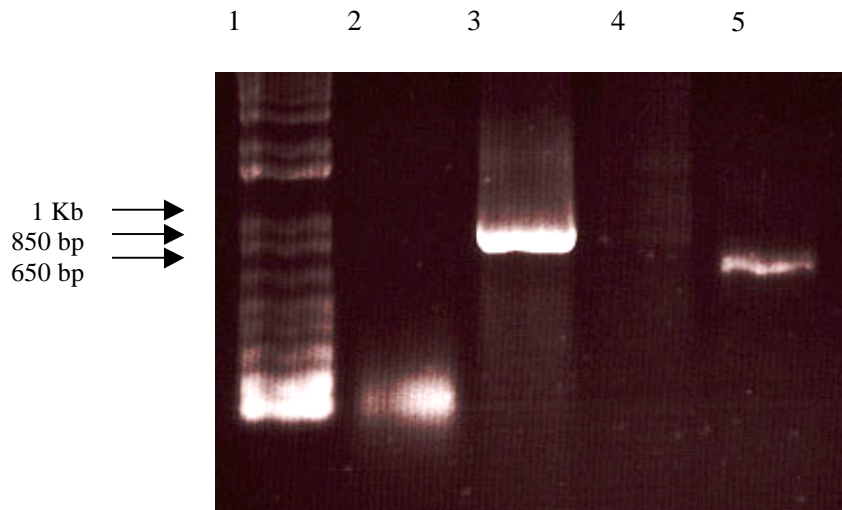
**Figura 13.** En la reacción de PCR 1), usando como templado el vector pDAN5-PRAI, el oligonucleótido que híbrida en el sitio de restricción HindIII y la ligación del casete del conector amino y el casete del asa 6 de TrpSa, se extendió la región 5' del gene de PRAI (650 bp). En la reacción de PCR 2) se utilizó como templado el vector pDAN5-PRAI, el oligonucleótido que híbrida en el sitio de restricción NheI y la ligación del casete del asa 6 de TrpSa y el casete carboxilo, para extender la región 3' del gene de PRAI (250 bp).



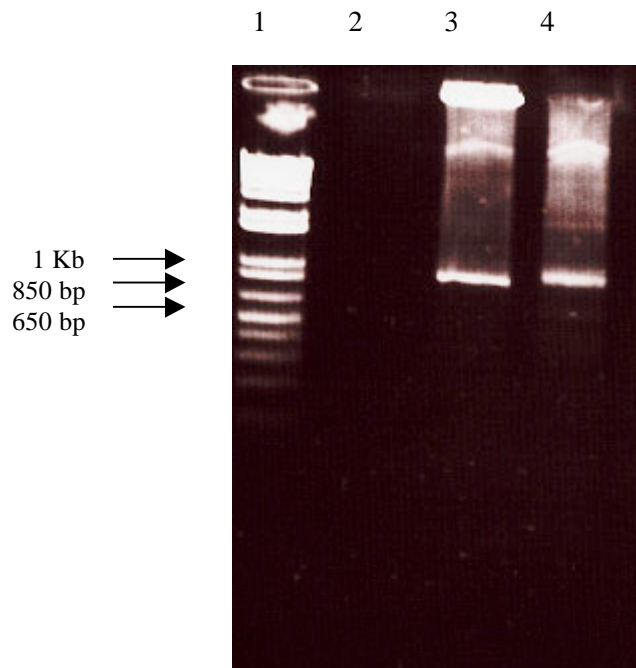
**Figura 14.** El gene de PRAI mutante flanqueado por los sitios de restricción HindIII (región 5') y NheI (región 3'). En el recuadro rojo se muestra la secuencia del conector amino y en azul la secuencia del conector carboxilo. La amplificación final del gene de PRAI mutante, obtenido por una reacción de PCR de superposición de los dos megaprimers, tiene un tamaño de 850 bp y tiene insertada la secuencia del asa 6 de la subunidad  $\alpha$  de triptofano sintetasa en la posición del asa 6 de PRAI. Tomado y Modificado de: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>



**Figura 15.** Gel nativo de Acrilamida 10%. Ligación de las hibridaciones complementarias para obtener los casetes de la región amino y carboxilo que portan la secuencia del asa 6 de triptofano sintetasa.



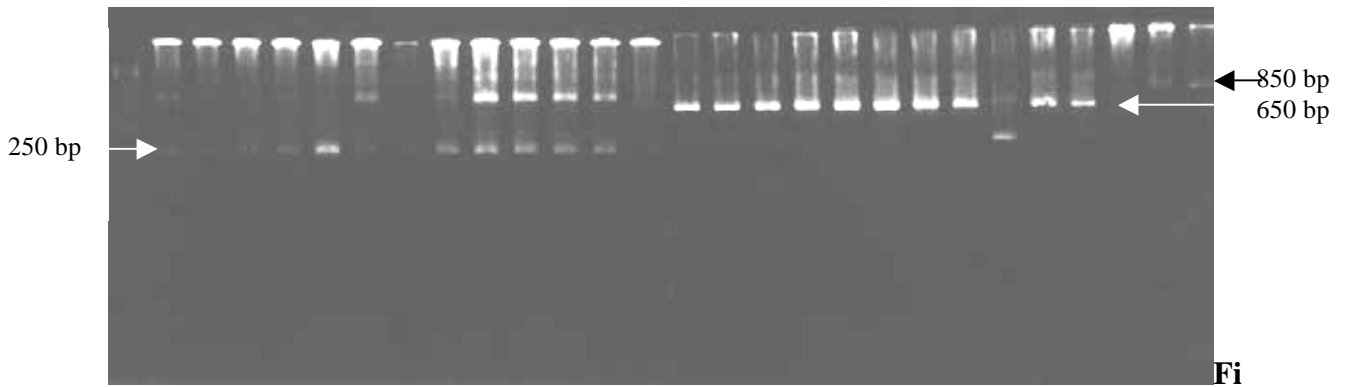
**Figura 16.** Gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador 1Kb Plus, Carril 2: Control negativo, Carril 3: Control positivo (PRAI silvestre, 850 bp), Carril 5: PCR megaprimer NHL6 (650 bp)



**Figura 17.** Gel de agarosa 1%. Carril 1: Marcador 1Kb Plus DNA ladder de Invitrogen®. Carril 2: Control negativo, Carril 3: Control positivo (PRAI silvestre, 850 bp), Carril 4: Reacción de extensión de primers con la que se genera el gen completo (850 bp)

Una vez que se obtuvo el gene ensamblado, éste se digirió y se ligó con el vector pDAN5-PRAI digerido con las enzimas de restricción *NheI* y *HindIII*, para después transformarlo en células electrocompetentes XL1Blue. Tras haber concluido con la electroporación, la recuperación y la incubación de las placas; los resultados obtenidos son los siguientes: en una placa de medio LB-Ampicilina plateada con 20 µl de cultivo celular se contaron 641 colonias dentro de un cuadrante de la caja, con este dato se determinó que en una caja con 100 µl de cultivo plateado se obtuvieron  $1.3 \times 10^4$  colonias, de las cuales el 0.23% corresponde a genotipo silvestre, porque, en una caja LB-ampicilina plateada con 20 µl de la electroporación de control negativo —plásmido religado— se contaron únicamente 6 colonias.

Los resultados anteriores permiten decir que el tamaño final del banco de 1 ml de cultivo recuperado fue de  $1.3 \times 10^5$  colonias, dentro del cual hay aproximadamente 300 colonias con genotipo PRAI silvestre que representan el 0.23% del banco obtenido. Con el banco de  $1.282 \times 10^5$  variantes obtenido, están representadas las 512 combinaciones esperadas y que son generadas por los codones *NNS* y *NNT* (*N*= A/G/C/T; *S*= C/G) y, para comprobar este resultado, se tomaron 23 colonias al azar y se purificó su DNA plasmídico. La primera aproximación, antes de la secuenciación, para saber si las clonas seleccionadas portaban la secuencia insertada fue someter a una reacción de PCR a 13 de los 23 plásmidos seleccionados. Para cada uno de los plásmidos se hicieron dos reacciones, la primera de ellas genera un fragmento de 250 bp y utiliza los oligonucleótidos L6TrpSCod y NheIAOL, ésta reacción extiende la región 3'-5' del gene, o bien, la región carboxilo terminal; la segunda reacción utiliza los oligonucleótidos HindIIIAOL y L6TrpSNoCod, ésta reacción genera un fragmento de 650 bp y extiende la región 5'-3' del gene correspondiente a la región amino terminal. Las 13 clonas extendieron los dos fragmentos esperados (Fig. 18).



**gura 18.** Gel de agarosa 1%. PCR de plásmido de colonia. Carril 1: 1 Kb Plus DNA ladder de Invitrogen®. Carriles 2-13 Reacción 1 de PCR. Carril 14: Control Negativo. Carriles 15-27 Reacción 2 de PCR. Carril 28: Control Positivo —extensión del gen PRAI silvestre usando los oligonucleótidos HindIII y NheI—.

Cuando las secuencias de las 23 clonas se recibieron, se hizo un alineamiento en el programa Clone Manager con el fin de corroborar la presencia de la secuencia correspondiente a: i) los oligonucleótidos HindIII y/o NheI ii) al conector amino y su variabilidad (Tabla 3) iii) a la secuencia correspondiente al asa6 de TrpS $\alpha$  y vi) secuencia del conector carboxilo. Las 23 clonas analizadas presentaron los conectores amino y carboxilo, y la secuencia procedente del asa6 de TrpS $\alpha$ , ninguna de las clonas analizadas fue PRAI silvestre. La variabilidad encontrada para los codones *NNS* y *NNT* (Tabla 3) muestra que no hubo redundancia en las secuencias, es decir, los codones que codifican para los aminoácidos en esta posición nunca se repitieron cuando se hizo la selección al azar para las colonias tomadas. Así, probablemente todas las combinaciones diseñadas están representadas dentro del banco construido y, así mismo, su distribución dentro de la placa es azarosa. La probabilidad de encontrar una clona con genotipo silvestre dentro de los 23 plásmidos analizados fue muy baja y, como era de esperarse, ninguna de las clonas fue alineada como PRAI silvestre.

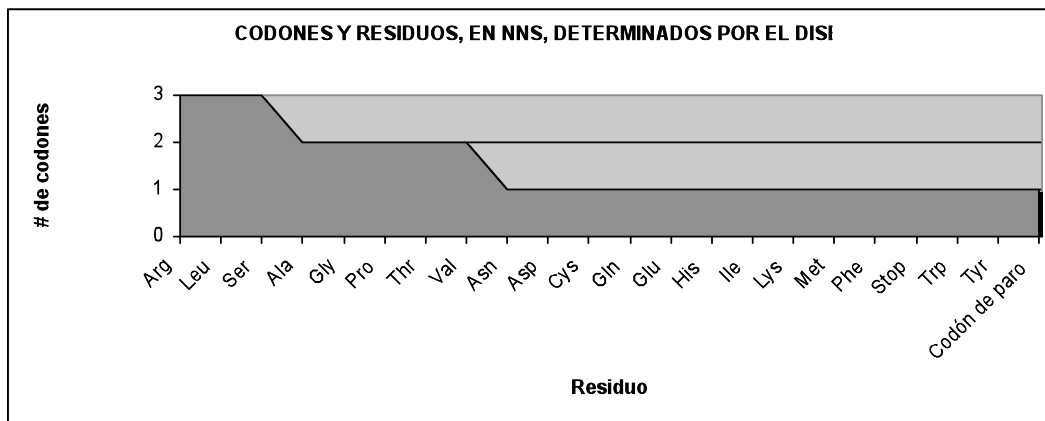
PRAIwt	V124 gtt	Val124	D126 gac	Asp126
Secuencia	Codón <i>NNS</i>	Traducción <i>NNS</i>	Codón <i>NNT</i>	Traducción <i>NNT</i>
1	cac	His	ctt	Leu

<b>2</b>	aac	Asn	ccg	Pro
<b>10</b>	acc	Thr	cgt	Arg
<b>13</b>	agc	Ser	cta	Leu
<b>1981</b>	aac	Asn	cat	His
<b>1982</b>	gtg	Val	act	Thr
<b>1983</b>	gac	Asp	tat	Tyr
<b>1984</b>	aac	Asn	act	Thr
<b>1985</b>	aac	Asn	agt	Ser
<b>1986</b>	tgc	Cys	tct	Ser
<b>1987</b>	gtg	Val	aat	Asn
<b>1988</b>	gag	Glu	tgt	Cys
<b>1989</b>	tag	<i>Codón de paro</i>	cat	His
<b>1992</b>	tcc	Ser	tct	Ser
<b>1993</b>	tac	Tyr	ggc	Gly
<b>1994</b>	acc	Thr	ccc	Pro
<b>1995</b>	ccg	Pro	acc	Thr
<b>1566</b>	atc	Ile	tct	Ser
<b>1567</b>	agc	Ser	ttc	Phe
<b>1568</b>	ttc	Phe	gct	Ala
<b>1569</b>	gac	Asp	gat	Asp
<b>1570</b>	atg	<i>Met/inicio</i>	gcc	Ala
<b>1571</b>	tgc	Cys	ggt	Gly
<b>1572</b>	acc	Thr	ctt	Leu
<b>1573</b>	agc	Ser	cct	Pro

**Tabla 3.** Variabilidad encontrada en los codones *NNS* y *NNT* del conector amino. Tamaño de muestra: 25 plásmidos.

El codón *NNS* en PRAI silvestre —*gtt*— codifica para el residuo 124Val, un aminoácido con grupo R no polar, localizado en el extremo carboxilo terminal de la hebra-β 6 y que apunta al interior del barril. Las combinaciones permitidas para el

codón **NNS** son 32 y el diseño concebido permite el uso de hasta tres codones diferentes para codificar un aminoácido; siendo así, el caso de los aminoácidos: Leu, Arg y Ser. Los aminoácidos codificados por dos codones diferentes son: Ala, Gly, Thr, Val y Pro. Los aminoácidos restantes sólo pueden ser codificados por un sólo codón, siendo de esta forma: Trp, Lys, Asn, Asp, Cys, His, Phe, Glu, Ile, Met, Tyr y un codón de paro —tag— (Fig. 19). Lo que puede observarse de este diseño es que no existe ninguna tendencia que favorezca la representación de aminoácidos con características químicas particulares (aminoácidos básicos, ácidos, con grupos R no polares o con grupos R polares sin carga) para los codones **NNS** y **NNT**. Lo que se busca es explorar los 20 aminoácidos en la posición **NNS** (y la posibilidad de encontrar un codón de paro) y 16 residuos para la posición **NNT** (excepto el residuo Ser, el cual está representado por dos codones diferentes: **tct**, **agt**) dentro del banco construido. El codón **NNT** codifica para los 15 aminoácidos: Leu, Pro, Arg, His, Thr, Tyr, Ser, Asn, Cys, Gly, Ala, Asp, Ile, Phe y Val (Fig. 21).



**Figura 19.** Gráfico que representa el número de codones, en **NNS**, que codifican para cada uno de los aminoácidos asignados por el diseño.

En términos generales, para el codón **NNS**, la probabilidad de encontrar un residuo codificado por tres codones diferentes es de 9.4%, para un residuo con dos codones es 6.3% y para los codificados por uno solo es de 3.1%. Para el codón **NNT** (Fig. 20), las

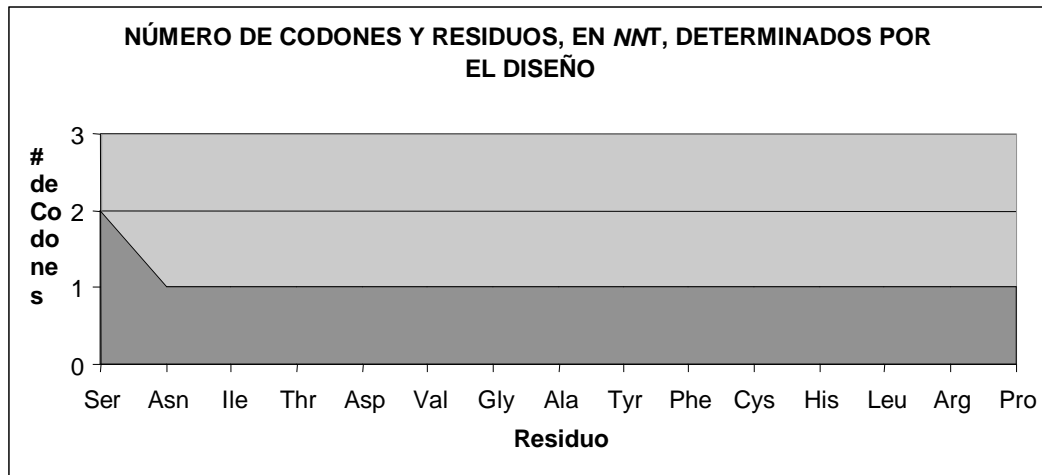
probabilidades son: 12.5% para un residuo codificado por dos codones diferentes y 6.3 % para un residuo con un solo codón. Haciendo un análisis meticuloso de los nucleótidos encontrados en el codón variable 124, se observa que la adenina está sobrerrepresentada en los dos primeros nucleótidos, mientras que la tercera posición que puede ser guanina (g) o citidina<sup>6</sup> (c), la citidina está representada tres veces más que la guanina; y esto dio como resultado la presencia de 4 clonas con el residuo Asn (aac) en la posición 124. Y una situación similar ocurrió para el triplete 126, en el cual se observa una marcada preferencia por citidina a expensas de timina en los dos primeros nucleótidos, mientras que en el tercero prevalece la presencia de timina, tal como lo estipula el diseño; también se observó la presencia de adenina, citosina y guanina en el último nucleótido del triplete, debida tal vez a una contaminación de estos nucleótidos en la mezcla. La tendencia por algunos residuos como la Asn en el codón 124, o Leu y Thr en el codón 126, fue producida por la diferencia en reactividad de los nucleótidos durante la síntesis química de los oligonucleótidos utilizados. Y aunque es una situación evaluada en la Unidad de Síntesis del IBT, cuando se incorpora la proporción de cada nucleótido a la mezcla, aún parece reflejarse cierta preferencia por algunos de ellos.

Los codones que no fueron vistos en esta muestra fueron: Phe, Val e Ile, que tienen en la segunda base de su codón una timina, nucleótido que está poco representado en la muestra tomada. Pero en realidad, el tamaño de la muestra tomada es pequeño como para poder extender conclusiones para esta librería; y tomando en cuenta los porcentajes de representación de cada base nucleotídica en cada una de las posiciones variables, se puede concluir que la combinación de nucleótidos menos representada en cada codón puede hallarse en una muestra de 2564 clonas. Siendo de tal forma que si el tamaño del banco obtenido fue de 128200 colonias, todas las combinaciones deben estar representadas en más de una ocasión a pesar de la tendencia de los oligonucleótidos.

---

<sup>6</sup> Citidina: nucleósido que se forma cuando la base nitrogenada Citosina se aparea con un anillo de ribosa a través de un enlace glucosídico  $\beta$ -N<sub>1</sub>.





**Figura 20.** Gráfico que representa el número de codones, en  $NNT$ , que codifican para cada uno de los aminoácidos asignados por el diseño.

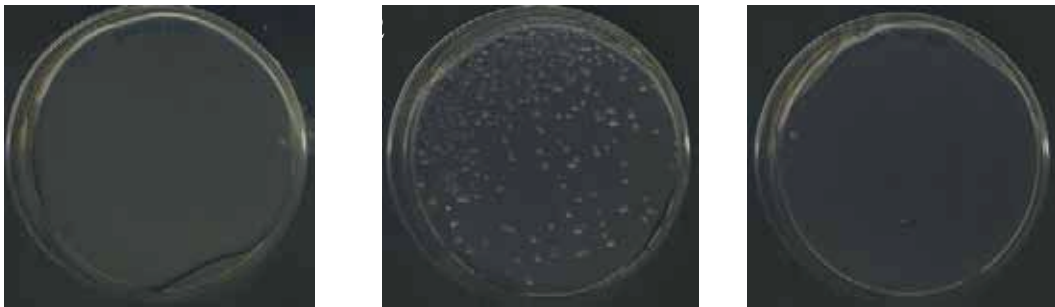
### 3. COMPLEMENTACIÓN GENÉTICA DE CEPAS AUXÓTROFAS

Todas las cepas auxótrofas utilizadas en este trabajo son  $F'$ . El manejo de estas cepas tiene como finalidad el incremento en la eficiencia de introducción de ADN en las células usando la infección por fagos. La complementación de estas cepas se hizo porque se encuentran disponibles en el laboratorio; pero también cabe señalar que todas comparten la característica de que a cada una de ellas le fue deletado el gene que codifica para una proteína con arquitectura de barril TIM, aunque la química de estas enzimas es diferente entre sí.

#### Complementación genética de la cepa $JM101trpF'::cicatriz\Delta trpF$ . Selección de variantes con actividad TrpF

El banco del asa 6 de Triptofano sintetasa fue utilizado para complementar genéticamente la actividad de la cepa  $\Delta trpF$  y para seleccionar las posibles variantes que cumplan con esta función. El cultivo celular fue plateado en placas de medio mínimo Vogel-Boner carentes de L-triptofano y adicionadas con ampicilina con o sin Difco® Casaminoácidos. Las placas se incubaron a  $30^\circ C$  y después de 24 y hasta 48 horas (Figs. 21 y 22) se contó el número de colonias. El número total de colonias en las placas de medio mínimo con Difco® Casaminoácidos fue de 52, mientras que en las placas de medio mínimo sin Difco® casaminoácidos el número total fue de 42 colonias. Con la finalidad de corroborar la complementación genética de esta cepa, se tomaron 17 colonias al azar de cada placa de medio mínimo y se crecieron en medio líquido LB adicionado con ampicilina a  $30^\circ C$  toda la noche. Finalmente, crecieron 11 colonias,

una de ellas perteneciente a medio mínimo sin Difco® Casaminoácidos y 10 provenientes de medio mínimo con Difco® casaminoácidos; se hizo la extracción de plásmido y se dispuso una reacción de PCR usando los oligonucleótidos L6TrpSCod y NheIAOL para cada uno de los plásmidos purificados. Para cada una de las muestras se amplificó el fragmento de 250 bp esperado, este primer resultado fue una primera aproximación para corroborar que la secuencia del asa 6 estaba insertada; sin embargo, este indicativo no aseguraba la complementación genética de la cepa, se mandaron a secuenciar y, después, se hizo un alineamiento de secuencias usando el programa Clone Manager. Todas las secuencias recibidas portaban el asa 6 de triptofano sintetasa. El ensayo pertinente se avocó a complementar genéticamente, con los plásmidos purificados y secuenciados, la función de la cepa JM101  $\Delta trpF$  de *E. coli* y confirmar la complementación de la cepa auxótrofa bajo las mismas condiciones.

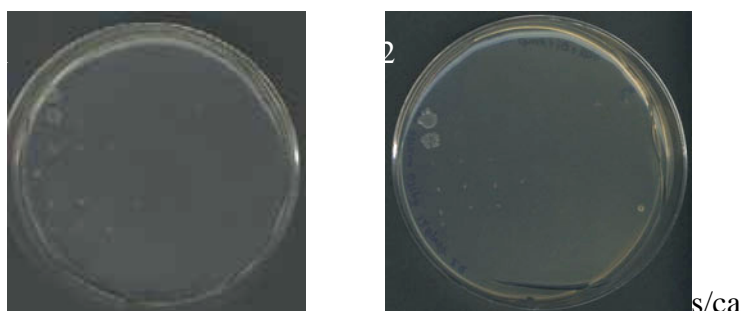


**Figura 21.** Complementación genética de la cepa  $\Delta trpF$ . Medio Mínimo sin Difco® Casaminoácidos. Caja 1: Librería asa 6 de TrpS. Caja 2: Control Positivo: pDAN5-PRAICAT. Caja 3: Control Negativo: cepa  $\Delta trpF$ .

**Figura 22.** Complementación genética de la cepa  $\Delta trpF$ . Medio Mínimo con Difco® casaminoácidos. Caja 1: Librería asa 6 de TrpS. Caja 2: Control Positivo pDAN5-PRAICAT. Caja 3: Control Negativo Cepa  $\Delta trpF$ .

Para verificar la complementación genética de la cepa auxótrofa  $\Delta trpF$  usando las 12 variantes, se hicieron diluciones 1:100 hasta 1: 1 000 000 para cada uno de los cultivos de las variantes seleccionadas (Tabla 4). Se tomaron 5  $\mu$ l de cada dilución y en

forma de goteo se colocó cada una de las diluciones en placas de medio mínimo con ampicilina y con o sin Difco® casaminoácidos. Transcurridas 84 horas no se observó crecimiento en ninguna de las diluciones, salvo el control positivo (Fig. 23); lo que sugiere que las colonias encontradas en las placas de medio mínimo Vogel-Boner fueron producto de la presencia de “césped” o células muertas de las que se alimentaron el resto, lo que originó la aparición de falsos positivos.



**Figura 23.** Diluciones de la complementación genética en la cepa  $\Delta trpF$ . Caja 1: Medio mínimo con Difco® casaminoácidos. De arriba hacia abajo y de izquierda a derecha: dilución 1:100 hasta 1: 1 000 000, control positivo pDAN5-PRAICAT y plásmidos retransformados. Caja 2: Medio Mínimo sin Difco® casaminoácidos.

La pérdida de actividad catalítica de PRAI, demostrada con este experimento, es congruente con los resultados presentados por Patrick, W y Blackburn J., trabajo en el cual insertan el epítoto FLAG dentro del asa 6 catalítica de PRAI de *E. coli* (FLAG-PRAI) y ésta pierde por completo la actividad catalítica, sus resultados son consistentes al presentar el rol crítico que desempeña el asa 6 para unir el sustrato PRA en la proteína PRAI, donde cualquier modificación en la secuencia aminoacídica de esta asa es fundamental para la función catalítica de la proteína (Patrick, W. and Blackburn, J. 2005).

PRAIwt	V124 gtt	Val124	D126 gac	Asp126
Secuencia	Codón <i>NNS</i>	Traducción <i>NNS</i>	Codón <i>NNT</i>	Traducción <i>NNT</i>
3172	ccg	Pro	gtt	Val
3173	aac	Asn	tct	Ser
3174	tag	<i>Codón de paro</i>	ccc	Pro
3175	atc	Ile	agc	Ser
3176	agg	Arg	ccc	Pro
3177	gtc	Val	cgt	Arg

<b>3178</b>	tgc	Ser	act	Thr
<b>3179</b>	ggc	Gly	ggt	Val
<b>3180</b>	ccg	Pro	ggt	Val
<b>3181</b>	cct	Pro	att	Ile
<b>3182</b>	atc	Ile	gct	Ala
<b>3183</b>	tac	Tyr	tat	Tyr

**Tabla 4.** Variabilidad encontrada en los codones *NNS* y *NNT* del conector amino para las clonas encontradas en la complementación genética de la cepa  $\Delta trpF$ .

Complementación genética en la cepa JM101::*cicatriz* $\Delta thiE$ . Selección de variantes con actividad ThiE

El residuo catalítico de la cadena alfa—barrile-( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>— de la enzima Tiamina fosfato sintetasa (PDB: 1g4e. E.C.: 2.5.1.3) es la Ser130. Los residuos se localizan en la región carboxilo terminal de la hebra- $\beta$  5 —sitio que alberga los residuos catalíticos para los barriles barriles-( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (Gerlt, 2000)—. La enzima Tiamina fosfato sintetasa cataliza la formación del compuesto tiamina fosfato a partir de 4-amino-5(hidroximetil)-2-metilpirimidin pirofosfato y 5-(hidroxietil)-4-metiltiazol fosfato (Peapus, D.H., *et al.* 2001). En un inicio, el residuo Ser130 activa el pirofosfato, y el grupo ionizado es capaz de reaccionar con el compuesto 5-(hidroxietil)-4-metiltiazol fosfato para producir tiamina fosfato. La estabilización del carbocatión intermediario está dada por la transferencia de protones del grupo amino de la pirimidina al pirofosfato para generar iminomethide pirimida, el cual, se piensa, es la molécula que se detecta en la estructura cristalográfica (Peapus, D.H., *et al.* 2001).

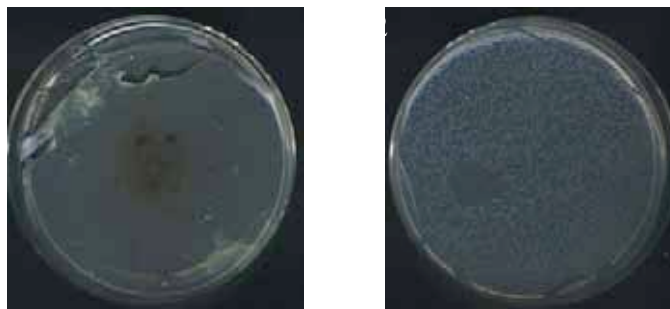
La complementación genética de la cepa  $\Delta thiE$  usando la librería del asa 6 de TrpS generó, en un principio, el crecimiento de 200 colonias en una placa de medio mínimo adicionada con ampicilina, Difco® Casaminoácidos y sin tiamina. Se tomaron 30 colonias al azar y se crecieron en medio líquido LB y ampicilina, se extrajo plásmido y se mandaron a secuenciar 11. El alineamiento de secuencia muestra que 8 de los 11 plásmidos tienen la secuencia correspondiente al asa 6 de la subunidad  $\alpha$  de Trp sintetasa, las tres secuencias restantes presentan inserciones y deleciones en los conectores amino y carboxilo y en el asa 6. La combinación de nucleótidos para los sitios *NNS* y *NNT*, en este ensayo, exhiben una variabilidad diferente a la encontrada para todas las secuencias analizadas en este trabajo (Tabla 5).

Las 8 secuencias analizadas se usaron para complementar genéticamente la cepa  $\Delta thiE$ . La estrategia utilizada fue como la empleada para la cepa  $\Delta trpF$ . La complementación de esta cepa causó muchos problemas desde el inicio del ensayo, y más tarde, con ayuda de una cinética de crecimiento usando la cepa sin transformar en medio mínimo líquido sin vitaminas y con o sin Difco® casaminoácidos, se confirmó que la presencia de Difco® casaminoácidos libres de vitaminas desencadena el crecimiento de esta cepa auxótrofa en medio mínimo y sin tiamina. Así, ninguna de las variantes encontradas complementó la cepa JM101::cicatriz $\Delta thiE$  y las colonias encontradas, a pesar de tener la secuencia del asa 6 modificada y la variabilidad en los codones *NNS* y *NNT*, por tanto, las clonas identificadas inicialmente fueron falsos positivos (Fig. 24).

Dado que los aminoácidos que forman el sitio activo de los barriles-( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> se localizan en el extremo carboxilo terminal de las hebras- $\beta$  comprendiendo parte de las asas que unen las hojas- $\beta$  a las hélices- $\alpha$  (asas  $\beta$ - $\alpha$ ), estas asas son en las que existe mayor variabilidad lo que sugiere la posibilidad de intercambiar la actividad catalítica sin comprometer la estabilidad de plegamiento (Gerlt, 2000; Vadrevu, et al, 2003; Livesay & La, 2006). En este caso particular, PRAI y ThiE catalizan dos tipos de reacción química diferentes; PRAI cataliza una reacción de isomerización, mientras que ThiE cataliza una reacción de transferencia de una pirimidina. Dado que ambas enzimas son barriles-( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>, y sus sitios catalíticos se localizan en las regiones definidas para este plegamiento, se decidió complementar genéticamente la cepa JM101::cicatriz $\Delta thiE$  con la expectativa de seleccionar variantes capaces de realizar esta reacción química. Las conclusiones plantean un rubro fundamental, el cual se centra en la idea de que la mutación de secuencia únicamente de un asa no es suficiente para lograr el cambio de función, inclusive cuando la mutación sitio-dirigida se generó en la zona que alberga los residuos catalíticos de los barriles TIM. En realidad, el sitio catalítico está conformado por residuos que se ubican en dos o tres de las asas en la parte superior del barril, así que el resultado obtenido no es inesperado. El objetivo del proyecto global, es generar variabilidad en varias de las asas y recombinar esta variabilidad en busca de un cambio de actividad.

PRAIwt	V124 gtt	Val124	D126 gac	Asp126
Secuencia	Codón <i>NNS</i>	Traducción <i>NNS</i>	Codón <i>NNT</i>	Traducción <i>NNT</i>
3226	agc	Ser	tgt	Cys
3227	aac	Asn	cat	His
3229	ggc	Gly	agt	Ser
3230	tcc	Ser	act	Thr
3231	gac	Asp	acc	Thr
3232	atc	Ile	act	Thr
3233	tcc	Ser	ggt	Gly
3234	tcg	Ser	act	Thr

**Tabla 5.** Variabilidad encontrada en los codones *NNS* y *NNT* del conector amino para las clonas encontradas en la complementación genética de la cepa  $\Delta thiE$ .

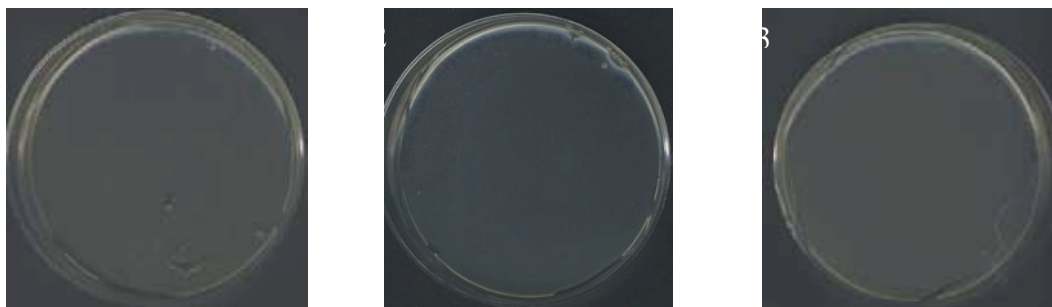


**Figura 24.** Complementación genética de la cepa  $\Delta thiE$ . Medio Mínimo con Difco® Casaminoácidos. Caja 1: Librería asa 6 de TrpS. Caja 2: Control Positivo puc18-ThiE.

#### Complementación genética en la cepa JM101:VR101: $\Delta TIM$

Tras haber transcurrido 144 horas de incubación a 30° C, en la complementación genética de esta cepa usando la librería del asa 6 de TrpS no se observó el crecimiento de colonias en las placas de medio mínimo con ampicilina con o sin Difco® casaminoácidos (Fig. 25). El control negativo (cepa  $\Delta TIM$  sin transformar) creció en 120 horas y el tamaño de las colonias no fue mayor a 1mm de diámetro, esto ocurre porque el sistema de selección para esta cepa no es tan estricto. Y para explicar el crecimiento bacteriano en las cajas de control negativo, desde el punto de vista metabólico, se basa en el hecho de que las células tienen las enzimas necesarias para iniciar la glucólisis y comienzan a crecer, pero cuando la ruta metabólica se ve interrumpida por la delección de la enzima TIM, la dihidroxiacetona comienza a

acumularse en el medio y no puede ser convertida a gliceraldehído-3P, entonces, el exceso de dihidroxiacetona se transforma en metilglioxal, un compuesto tóxico para la célula.

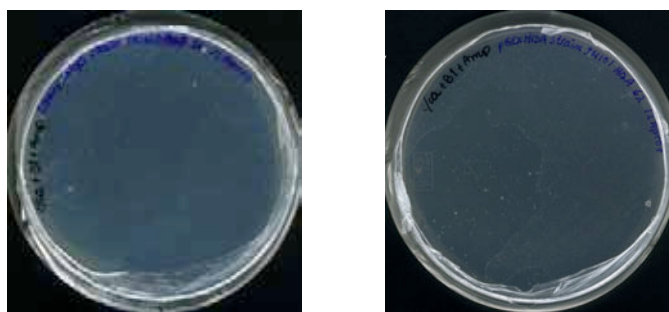


**Figura 25.** Complementación genética de la cepa  $\Delta TIM$ . Medio Mínimo sin Difco® Casaminoácidos. Caja 1: Librería asa 6 de TrpS. Caja 2: Control Negativo: Cepa  $\Delta TIM$ . Caja 3: Control Positivo: cepa transformada con el vector puc18-ThiE.

Complementación genética de la cepa. Selección de variantes con actividad HisA  
Después de platear en medio mínimo adicionado con ampicilina e incubar por 52 horas las células JM101::cicatriz $\Delta hisA$  transformadas con el banco (Fig. 26), se observó el crecimiento de 48 colonias, mientras que en el mismo medio suplementado con Difco® casaminoácidos, se obtuvieron 140 colonias. Se tomaron 7 colonias del medio sin casaminoácidos para extraer plásmido y verificar, en una re-transformación la complementación genética de la cepa  $\Delta hisA$ .

Los 7 plásmidos se mandaron a secuenciar y, posteriormente, se hizo el alineamiento de sus secuencias. Se observó que 6 colonias portaban las secuencias translocadas, y la colonia restante tenía, a lo largo de su secuencia, inserciones, deleciones y mutaciones silenciosas.

La complementación de esta cepa usando el banco del asa 6 de TrpS generó, como en el caso de la cepa  $\Delta thiE$ , falsos positivos, y estas variantes fueron descartadas para complementar genéticamente la cepa  $\Delta hisA$ . El primer paso fue elaborar una cinética de crecimiento de la cepa  $\Delta hisA$  en medio mínimo líquido en presencia y ausencia de Difco® Casaminoácidos. De esta forma se concluyó que ninguna de las clonas fue capaz de complementar la actividad de *hisA*. En este tipo de experimentos es común encontrar falsos positivos, debido quizás al elevado número de células que se platean en el primer paso de selección, que en un momento dado pueden lisarse, aportando los nutrientes necesarios para la sobrevivencia de algunas de ellas. Es por eso que se requiere de una posterior verificación.



**Figura 26.** Complementación genética de la cepa  $\Delta hisA$ . Medio mínimo. Caja 1: Librería asa 6 de TrpS. Caja 2: control positivo pGEX-HisA.

#### 4. CAT COMO REPORTERO de PLEGAMIENTO. ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD del BANCO del ASA 6 de PRAI con SDS-PAGE.

La fusión del banco del asa 6 de PRAI al reportero CAT en el vector pDAN5-PRAICAT tiene como finalidad analizar la solubilidad de las proteínas que integran la librería; y para lograr este objetivo se recurrió a la fusión del reportero de plegamiento CAT.

La ligación para subclonar el banco del asa6 de PRAI en el vector pDAN5-PRAICAT, el control negativo —plásmido recircularizado— y el control positivo —vector pDAN5-PRAICAT— se electroporaron usando células XL1-BLUE y como se ha descrito en el apartado 4.4. Los resultados obtenidos cuando se platearon diferentes volúmenes de cultivo recuperado y después de 38 horas de incubación fueron: en un caja de medio LB-ampicilina plateada con 400  $\mu$ l de cultivo recuperado se contaron 1 726 colonias correspondientes a la subclonación del banco del asa 6 de TrpS en el vector pDAN5-PRAICAT, mientras que en la caja de medio LB-ampicilina-cloranfenicol(20  $\mu$ g/mL) plateada con el mismo volumen de cultivo recuperado crecieron dos colonias; en ninguna de las cajas plateadas con el vector religado se presentó crecimiento bacteriano, por lo que se descarta la posibilidad de encontrar genotipo silvestre. Finalmente, se tomaron 2 colonias de la caja de medio LB-ampicilina y una colonia crecida en medio LB-Ampicilina-Cloranfenicol (Secuencia 8687) (Tabla 6), se crecieron como se hizo en el apartado 4.4, se extrajo plásmido y se verificó por secuenciación la inserción del asa 6 de Triptofano sintetasa en el asa 6 de PRAI, y la variabilidad de los codones 124 y 126. La concentración de 20  $\mu$ g/ml de cloranfenicol en medio Luria-Bertani fue determinada en ensayos previos; se sabe que



esta es la concentración ideal a la cual la fusión PRAI-CAT puede plegarse sin problema, ya que se ha obtenido un alto porcentaje de mutantes de PRAI fusionadas a CAT que resisten esta concentración de cloranfenicol en medio Luria Bertani (comunicación personal Dra. Gloria Saab-Rincón & Adrián Ochoa).

<b>PRAIwt</b>	<b>V124 gtt</b>	<b>Val124</b>	<b>D126 gac</b>	<b>Asp126</b>
<b>Secuencia</b>	Codón <i>NNS</i>	Traducción <i>NNS</i>	Codón <i>NNT</i>	Traducción <i>NNT</i>
<b>8687</b>	gac	Asp	act	Thr
<b>8688</b>	acc	Thr	tct	Ser
<b>8689</b>	gac	Asp	act	Thr

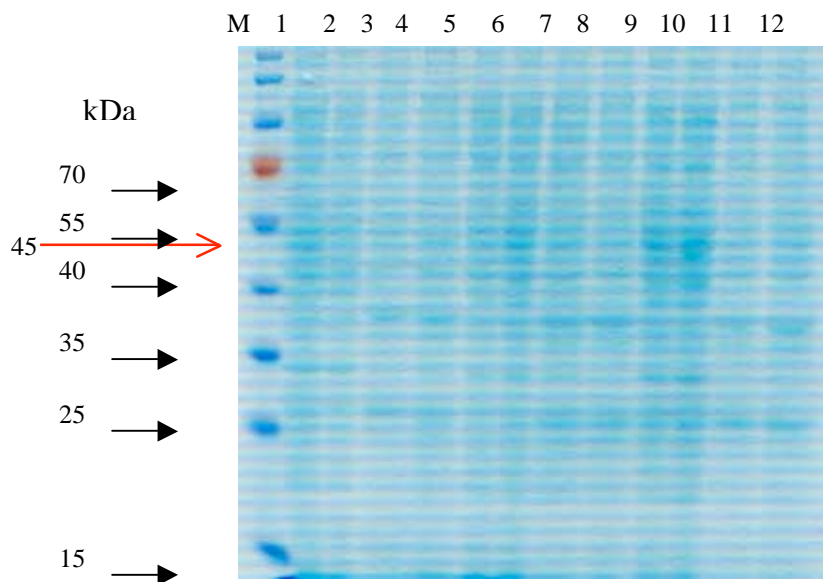
**Tabla 6. Variabilidad encontrada para 3 mutantes de PRAI fusionadas a CAT que crecieron en cloranfenicol.**

Para analizar la solubilidad de tres mutantes de PRAI se preparó un corrimiento electroforético de proteínas de las fracciones solubles e insolubles de tres diferentes cultivos, inducidos y no inducidos, de mutantes de PRAI y PRAI silvestre, todas ellas fusionadas a CAT. La inducción para sobreexpresar las fusiones se hizo con una concentración de 0.25 mM (stock 1 000 x) de IPTG, esta es una concentración estándar que teóricamente asegura la sobreexpresión de PRAI-CAT. La masa molecular de PRAI es de 23 kDa y la de CAT es de 22 kDa, por lo tanto, la masa molecular esperada de la fusión oscila en 45 kDa.

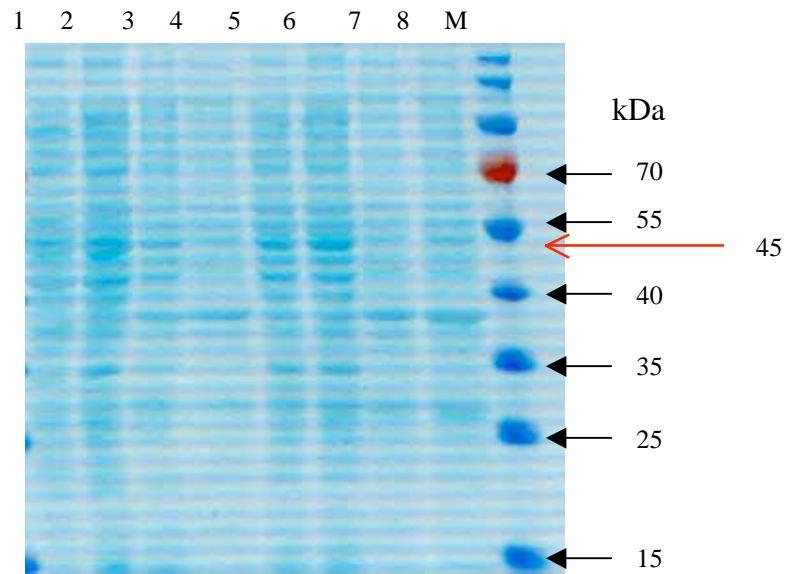
Con base en el análisis de secuencia de las tres mutantes elegidas, y en la observación del gel de poliacrilamida teñido, los resultados son: La secuencia de la mutante 8687 no está en fase, la base Tiamina falta al inicio de la secuencia del conector amino, por lo que su transcripción y traducción no se llevó a cabo correctamente, de tal manera que la fusión de esta proteína, en el corrimiento electroforético, no se observa en ninguna de las fracciones del lisado celular (Fig. 27, carriles 1-4). Con respecto a las dos fusiones restantes, la mutante 8688 y 8689 están en fase, y cada una de ellas puede observarse en la fracción soluble (Fig. 27, carriles 5-6; Fig. 28, carril 2). Existe una diferencia de concentración de proteínas de estas dos mutantes, diferencia que es claramente visible en los geles de poliacrilamida-SDS; la banda correspondiente a la proteína mutante 8689 se localiza en la fracción soluble del cultivo no inducido y en la fracción soluble del cultivo inducido con IPTG; sin embargo, también hay una pequeña concentración de esta proteína en la fracción insoluble del cultivo no inducido, y la

insolubilidad de una proteína se explica como la ruptura de interacciones entre los aminoácidos de la cadena polipeptídica al momento de plegarse y adoptar una conformación tridimensional, y estos cúmulos de cadenas no plegadas se albergan en los cuerpos de inclusión que representan la fracción insoluble del cultivo celular. Finalmente, este cambio de secuencia del asa 6 de PRAI no fue un cambio que satisficiera la estructura del andamiaje, ya que solo dos clona crecieron en medio LB y cloranfenicol, por lo que se concluye que este cambio de secuencia no favorece el plegamiento del banco de mutantes de PRAI. Las interacciones que se establecen entre los aminoácidos de la nueva cadena polipeptídica no son posibles de deducir; sin embargo, existe la posibilidad de modelar las interacciones entre los residuos del asa translocada y los residuos 124 y 126 variables, sin descartar las interacciones con el solvente, y definir la estructura tridimensional de alguna mutante que integra el banco.

El Western Blot diseñado para complementar el análisis de solubilidad y corroborar la presencia del reportero de plegamiento CAT no fue exitoso. Aunque a nivel de secuencia de DNA se sabe que PRAI debe estar fusionada a CAT en el vector pDAN5-PRAICAT, el Western Blot no generó la señal correspondiente a la presencia de CAT cuando se reveló usando el sustrato para el anticuerpo secundario —fosfatasa alcalina— acoplado al anticuerpo primario —antiCAT—.



**Figura 27.** Gel de poliacrilamida-SDS 10%. M: Marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder de Fermentas®. Carriles 1-2: Fracciones solubles de PRAI-CAT mutante 8687, no inducida e inducida, respectivamente. Carriles 3-4: Fracciones insolubles de PRAI-CAT mutante 8687, no inducida e inducida, respectivamente. Carriles 5-6: Fracciones solubles de PRAI-CAT mutante 8688, no inducida e inducida, respectivamente. Carriles 7-8: Fracciones insolubles de PRAI-CAT mutante 8688, no inducida e inducida, respectivamente. Carriles 9-10: Fracciones solubles de PRAI-CAT silvestre, no inducida e inducida, respectivamente. Carriles 11-12: Fracciones insolubles de PRAI-CAT silvestre, no inducida e inducida, respectivamente



**Figura 28.** Gel de poliacrilamida-SDS 10%. Carriles 1-2: Fracciones solubles de PRAI-CAT mutante 8689, no inducida e inducida, respectivamente. Carriles 3-4: Fracciones insolubles de PRAI-CAT mutante 8689, no inducida e inducida, respectivamente. Carriles 5-6: Fracciones solubles de PRAI-CAT silvestre, no inducida e inducida, respectivamente. Carriles 7-8: Fracciones insolubles de PRAI-CAT silvestre, no inducida e inducida, respectivamente. M: Marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder de Fermentas®.

## CONCLUSIONES

El ensayo de complementación genética de cepas auxótrofas es una estrategia que ha demostrado ser útil para seleccionar variantes con actividad catalítica novedosa, pero es importante denotar que se trata de un método que exige condiciones rigurosas para su manipulación, y que requiere de ciclos iterativos de transformación y selección para descartar la presencia de falsos positivos encontrados durante el proceso de selección y corroborar la existencia de variantes inequívocas.

Para complementar la estrategia experimental, el banco de mutantes se fusionó a gen reportero con la finalidad de analizar la estabilidad de plegamiento de la librería obtenida y verificar la fusión de CAT. Los resultados obtenidos sugieren que la sustitución de secuencia del asa 6 de PRAI desequilibra el plegamiento de la proteína, inclusive cuando se ha demostrado que PRAI es un andamiaje estable y se han sustituido o adicionado elementos secundarios en su estructura. Con base en información obtenida recientemente en el grupo de trabajo de este proyecto (comunicación personal de la Dra. Gloria Saab R.), se sabe que hasta el 75% de diferentes bancos de mutantes sobrevive en medio nutritivo adicionado con cloranfenicol; este dato coincide con diversos reportes bibliográficos que demuestran la tolerancia de grandes cambios de secuencia que codifica para el asa 6 y otras regiones de esta proteína. En este trabajo, el análisis de plegamiento del banco de mutantes del asa 6 de triptofano sintetasa presenta que la sustitución de esta asa de 9 aminoácidos por una secuencia de 15 aminoácidos pertenecientes al asa 6 de la subunidad alfa de triptofano sintetasa no fue tolerada por la proteína, aun cuando se trata de enzimas homólogas que catalizan reacciones continuas en la ruta de biosíntesis de triptofano, no se esperaba que el cambio de secuencia afectara el plegamiento, sin embargo, puede pensarse que todas las combinaciones de los codones variables y la sustitución del asa no fue favorable para el plegamiento de las proteínas mutantes; porque las interacciones entre ellos no son las adecuadas para generar los ambientes adecuados para plegar la cadena polipeptídica; sin embargo, estos datos sólo pueden establecerse cuando se obtiene la información estructural pertinente; una aproximación válida se advierte usando herramientas bioinformáticas que permitan predecir las interacciones establecidas entre los aminoácidos variables y entre todos los aminoácidos localizados a su alrededor. Un argumento para explicar el bajo rendimiento de plegamiento del banco

de mutantes es la presencia de inconsistencias durante el proceso de subclonación del banco de mutantes del asa 6 de Triptofano sintetasa en el vector de expresión pDAN5-PRAICAT; como pueden ser un error de secuencia cuando se sintetizan los oligonucleótidos usados para insertar secuencias reconocidas por las enzimas de restricción o, tal vez, la ausencia de la secuencia nucleotídica completa del vector que tiene la secuencia del gen de CAT fusionado. Es posible que exista un error en el marco de lectura por la inserción de bases nucleotídicas dentro del gene mutante, lo cual imposibilita la correcta expresión de las proteínas fusionadas. Aun cuando se hizo el corrimiento del control positivo en el Western Blot y no se observó nada, tal vez algún reactivo estaba en malas condiciones, ya que la observación en el gel de proteínas teñido con coomassie parece identificarse la fusión de la proteína CAT y el gene mutante de PRAI, también, al presentarse el crecimiento de colonias bacterianas en medio nutritivo suplementado con cloranfenicol, puede concluirse que la proteína CAT se está produciendo activa; y por lo tanto, de todas las combinaciones posibles de aminoácidos en las posiciones variables, sólo existen dos combinaciones que permiten el plegamiento de la cadena polipeptídica; y estas combinaciones son las que se toleran en la región variable que codifica para el extremo carboxilo de la hoja beta 6 que conecta la inserción del asa 6 de la subunidad alfa de triptofano sintetasa.

Este trabajo tiene implicaciones en el desarrollo del proyecto global, en el cual, cuando se recombinen todas las asas intercambiadas, se buscará con los métodos de selección disponibles en el laboratorio, nuevas funciones catalíticas para este andamiaje. Aun cuando los resultados eran, en términos generales, predecibles, los objetivos planteados se cumplieron siguiendo la estrategia experimental planteada.

## PERSPECTIVAS

PRAI es el andamiaje ideal para impulsar diseños ingenieriles de proteínas que buscan catalizar reacciones químicas precisas y de interés multidisciplinario, ya que se ha demostrado que tolera cambios en su secuencia sin afectar gravemente su conformación estructural, aunque los resultados descritos en este trabajo demuestren lo contrario; sin embargo, es posible que el problema radique en la estabilidad de plegamiento de la cadena polipeptídica mutante.

Para ampliar la exploración del espacio de secuencia usando este andamiaje y la estrategia experimental descrita en este trabajo, se ha propuesto la recombinación de las asas translocadas y la recombinación de las mitades de PRAI que llevan insertados todos los cambios de secuencia diseñados. Con estas mutantes de PRAI se probarán los métodos de selección con el objetivo de encontrar variantes con nuevas actividades catalíticas para caracterizarlas bioquímicamente y, posiblemente, examinar su estructura tridimensional.

Las estrategias experimentales aplicables a todo este proyecto son extensas, desde el barajeo de DNA, mutagénesis a saturación, recombinación de todas las asas en todas las combinaciones posibles, recombinación de mitades de PRAI. Y toda la información recabada en este proyecto apuntaría a recopilar datos estructurales que definan un posible código de plegamiento y reglas que definan las regiones que toleran cambios drásticos en la secuencia, pero sin afectar la estabilidad de plegamiento.

Y porque el enfoque evolutivo no debe ser relegado, sería interesante ahondar, con toda la información recabada, en la filogenia para los miembros de esta familia y plantear escenarios evolutivos que fortalezcan las teorías existentes.

## APÉNDICE<sup>7</sup>

### MEDIOS DE CULTIVO

#### 1. Medio Luria-Bertani

- 10 g Triptona
- 5 g Extracto de Levadura
- 10 g NaCl
- Aforar a 1 L con agua grado milliQ. Esterilizar.

*Para medio sólido*

- 15 g Bacto Agar

#### 2. Medio Mínimo M9

- 10 ml Glucosa 20%
- 312 µl de Casaminoácidos estériles (20 mg/ml)
- 100 ml Sales M9 10X
- 1 ml Vitamina B1 (10 mg/ml)
- 1 ml MgSO<sub>4</sub> 1M
- 1 ml CaCl<sub>2</sub> 50 mM
- Aforar a 1 L con agua grado milliQ

*Para medio sólido*

- 15 g Agar Noble

#### 3. SOC (1L)

- 20 g Triptona
- 5 g Extracto de Levadura
- 10 ml NaCl 1M
- 2.5 ml KCl 1M
- 20 ml Glucosa 1M
- Aforar a 1L

### ANTIBIÓTICOS

	Solución	Stock
	(1000x) *	

---

<sup>7</sup> Sambrook, J., *et al.* 1989.



Ampicilina	200 mg/ml H <sub>2</sub> O
Kanamicina	10 mg/ml H <sub>2</sub> O
Tetraciclina	5 mg/ml Etanol 100%

#### SOLUCIONES

##### 1. Sales M9 (10x) 1L

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 172.2 mM. 15 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 422.6 mM. 64 g
- NaCl 85.5 mM. 2.5 g
- NH<sub>4</sub>Cl 186.9 mM. 5.0 g

*Esterilizar por autoclave*

##### 2. PBS (1x) 1L

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM. 0.24 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM. 1.44 g
- NaCl 137 mM. 8 g
- KCl 3mM. 0.2 g
- 800 ml de agua mQ

*Ajustar pH 7.4 con HCl. Aforar a 1 L con agua grado milliQ. Esterilizar*

##### 3. Solución Stock de Acrilamida 20% 8M Urea

- Acrilamida 57 g
- Bis-Acrilamida 3 g
- Urea 144 g
- Buffer (TAE 10x) 30 ml
- Agua grado milliQ y aproximadamente 300 ml

##### 4. Solución Stock de Acrilamida 15% 7M Urea

- Acrilamida 14.27 g
- Bis-Acrilamida 0.75 g
- Urea 42 g
- Buffer (TAE 10x) 10 ml
- Agua grado milliQ 46 ml

##### 5. Solución Stock de Acrilamida 30%

Acrilamida 29 g

Bis-Acrilamida 1 g

Aforar a 100 mL con agua grado milliQ. Guardar a 4°C.

##### 6.-Upper Gel Solution pH 6,8

- Tris-base 6.05 g (0.5 M)
- SDS grado electroforesis 0.4 g (0.4%)
- Ajustar a pH 6.8 con HCl
- Aforar a 100 mL con agua grado milliQ

##### 7.-Lower Gel Solution pH 8,8

- Tris-base 18.1 g (1.5 M)
- SDS grado electroforesis 0.4 g (0.4%)

- Ajustar pH 8.8 con HCl
  - Aforar a 100 mL con agua grado milliQ
- 8.-Tris-Glicina 5x
- Tris-base 15 g (125 mM)
  - Glicina grado electroforesis 72 g (1M)
  - SDS grado electroforesis 5 g (5%)
  - Aforar a 1 L con agua grado milliQ
- 9.-Gel Loading Buffer 4x para Proteína
- Glicerol 2mL (2%)
  - SDS 10% 4 mL (4%)
  - Tris 1M pH 6.8 2.5 mL (250 mM)
  - Azul de Bromofenol 1% 0.5 mL (0.05%)
  - Agregar 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol
10. PSA 10%
- Persulfato de Amonio 1 g
  - Aforar a 10 ml
1. Buffer de Elución para oligonucleótidos
- SDS 0.1%
  - Acetato de Amonio 0.5 M
  - Acetato de Magnesio 10 mM
- 12.-Coomasie
- Azul de coomasie 0.2 g (0.1%)
  - Metanol 100 mL (50%)
  - Ácido acético glacial 20 mL (10%)
  - Aforar 200 mL con agua grado milliQ
- 13.- Disolución Desteñidora
- Metanol 500 mL (50%)
  - Ácido acético glacial 100 mL (10%)
  - Aforar a 1L con agua grado milliQ

## REFERENCIAS

- Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., Gould, S., Roodvelt, C. and Tawfik, S. (2004). The “evolvability” of promiscuous protein functions. *Nature Genetics*.
- Akanuma, S. and Yamagishi, A. (2005). Identification and Characterization of Key Substructures Involved in the Early Folding Events of a ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel Protein as Studied by Experimental and Computational Methods. *Journal of Molecular Biology*. **353**: 1161-1170.
- Apic, G., Gough, J. and Teichmann, S. (2001). Domain Combinations in Archaeal, Eubacterial and Eukaryotic Proteomes. *Journal of Molecular Biology*. **310**: 311-325.
- Arnold, F. (2006). Fancy footwork in the sequence space shuffle. *Nature*. **24**: 328-330.
- Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K. and Gerhenson, A. (2001). How enzymes adapt: lesson from directed evolution. *TRENDS in Biochemical Sciences*. **26**: 100-106.
- Axe, D.D. (2004). Estimating the Prevalence of Protein Sequences Adopting Functional Enzyme Folds. *Journal of Molecular Biology*. **341**: 1295-1315.
- Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A., Corran, P.H., Furth, A.J., Milman, J.D., Offord, E., Priddle, J.D. and Waley, S.G. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5Å resolution using aminoacid sequence data. *Nature*. **255**: 609-614.
- Barona-Gómez, F. and Hodgson, D. (2003). Occurrence of a putative ancient-like isomerase involved in histidine and tryptophan biosynthesis. *EMBO reports*. **4**: 296-300.
- Bartlett, G., Porter, C., Borkakoti, N. and Thornton, J. (2002). Analysis of Catalytic Residues in Enzyme Active Sites. *Journal of Molecular Biology*. **324**: 105-121.
- Bertolaet, B.L. and Knowles, J.R. (1995). Complementation of fragments of triose phosphate isomerase defined by exon boundaries. *Biochemistry*. **34**: 5736-5743.
- Bloom, J., Meyer, M., Meinhold, P., Otey, C., MacMillan, D. and Arnold, F. (2005). Evolving strategies for enzyme engineering. *Current Opinion in Structural Biology*. **15**: 447-452.
- Bornberg-Bauer, E. and Chan, H.S. (1999). Modeling evolutionary landscapes: Mutational stability, topology, and superfunnels in sequence space. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 10689-10694.
- Chatterjee, R. and Yuan, L. (2006). Directed evolution of metabolic pathways. *Trends in Biotechnology*. **24**: 28-38.
- Chen, R. (2001). Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *Trends in Biotechnology*. **19**: 13-14.
- Chica, R., Doucet, N. and Pelletier, J. (2005). Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Current Opinion in Biotechnology*. **16**: 378-384.
- Cogarad, L. and Deem, M. (1999). A hierarchical approach to protein molecular evolution. *PNAS*. **96**: 2591-2595.
- Copley, R. and Bork, P. (2000). Homology among ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> Barrels: Implications for the Evolution of Metabolic Pathways. *Journal of Molecular Biology*. **303**: 627-640.

- Dalby, P. (2003). Optimizing enzyme function by directed evolution. *Current Opinion in Structural Biology*. **13**: 500-505.
- Dwyer, MA., Looger, LL. and Hellinga, HW. (2004). Computational design of a biologically active enzyme. *Science*. **304**: 1967-1971.
- Díaz-Mejía, J.J., Pérez-Rueda, E. and Segovia, L. (2007). A network perspective on the evolution of metabolism by gene duplication. *Gene Biology*. **8**:R26.
- Eberhard, M., Tsai-Pflugfelder, M., Bolewska, K., Hommel, U. and Kirschner, K. (1995). Indolglycerol Phosphate Synthase-Phosphoribosyl Anthranilate Isomerase: Comparison of the Bifunctional Enzyme from *Escherichia coli* with Engineered Monofunctional Domains. *Biochemistry*. **34**: 5419-5428.
- Fedorov, A. N. and Baldwin, T.O. (1997). Cotranslational Protein Folding. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**: 32715-32718.
- Feilmeier, B.J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. and Phillips, G.J. (2000). Green Fluorescent Protein Functions as a Reporter for Protein Localization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **182**: 4068-4076.
- Fox, R., Davis, C., Mundorff, E., Newman, L., Gavrilovic, V., Ma, S., Chung, L., Ching, C., Tam, S., Muley, S., Grate, J., Gruber, J., Whitman, J., Sheldon, R. and Huisman, G. (2007). Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nature Biotechnology*. **25**: 338-344.
- Gerlt, J. (2000). New wine from old barrels. *Nature Structural Biology*. **7**: 171-173.
- Gerlt, J. and Babbitt, P. (2001). Barrels in pieces?. *Nature Structural Biology*. **8**: 5-7.
- Gerlt, J. and Babbitt, P. (1998). Mechanistically diverse enzyme superfamilies: the importance of chemistry in the evolution of catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*. **2**: 607-612.
- Gerlt, J. and Babbitt, P. (2000). Can sequence determine function. *Genome Biology*. **5**: 1-10.
- Gerlt, J. and Babbitt, P. (2001). DIVERGENT EVOLUTION OF ENZYMATIC FUNCTION: Mechanistically Diverse Superfamilies and Functionally Distinct Suprafamilies. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 209-246.
- Gerlt, J. and Raushel, F. (2003). Evolution of function in ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*. **7**: 252-264-
- Gould, S.M. and Tawfik, S.M. (2005). Directed evolution of the promiscuous esterase activity of carbonic anhydrase II. *Biochemistry*. **44**: 5444-5452.
- Gualfetti, P. J., Iwakura, M., Lee, J.C., Kihara, H., Bilsel, O., Zitzewitz, J.A. and Matthews, C.R. (1999). Apparent Radii of the Native, Stable Intermediates and Unfolded Conformers of the  $\alpha$ -Subunit of Tryptophan Synthase from *E. coli*, a TIM Barrel Protein. *Biochemistry*. **38**: 13367-13378.
- Hellinga, H.W. and Richards, F.M. (1991). Construction of new ligand binding sites in proteins of known structure. II. Computer-aided modeling of sites with pre-defined geometry. *Journal of Molecular Biology*. **3**: 763-785.
- Hellinga, H.W., Caradonna, J.P. and Richards, F.M. (1991). Construction of new ligand binding sites in proteins of known structure. II. Grafting of a buried transition metal binding site into *Escherichia coli* thioredoxin. *Journal of Molecular Biology*. **3**: 787-803.
- Henn-Sax, M., Thoma, R., Schmidt, S., Hennig, M., Kirschner, K. and Sterner, R. (2002). Two ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Enzymes of Histidine and Tryptophan Biosynthesis Have Similar Reaction Mechanisms and Common Strategies for Protecting Their Labile Substrates. *Biochemistry*. **41**: 12032-12042.

- Höcker, B. (2005). Directed evolution of ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel enzymes. *Biomolecular Engineering*. **22**: 31-38.
- Höcker, B., Beissmann, S., Driemeyer S., Hettwer, S., Lustig, A. and Sterner, R. (2001). Dissection of a ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel enzyme into two folded halves. *Nature*. **8**: 32-36.
- Hommel, U., Eberhard, M. and Kirschner, K. (1995). Phosphoribosyl Anthranilate Isomerase Catalyzes a Reversible Amadori Reaction. *Biochemistry*. **34**: 5429-5439.
- Honig, B. (1999). Protein Folding: From the Levinthal Paradox to Structure Prediction. *Journal of Molecular Biology*. **293**: 283-293.
- Horowitz, N.H. (1945) On the Evolution of Biochemical Syntheses. *PNAS*. **31**: 153-157.
- Huang, H., Holden, H. and Raushel, F., (2001). Channeling of Substrates and Intermediates in Enzyme-Catalyzed Reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 149-180.
- Jordan, I., Kondrashov, F., Adzhubel, I., Wolf, Y., Koonin, E., Kondrashov, A. and Sunyaev, S. (2005). A universal trend of amino acid gain and loss in protein evolution. *Nature*. **433**: 633-638.
- Jürgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M. and Sterner, R. (2000). Directed evolution of a ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *PNAS*. **97**: 9925-9930.
- Khersonsky, O., Roodveldt, C. and Tawfik, D. (2006). Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Current Opinion in Chemical Biology*. **10**: 498-508.
- Koonin, E., Wolf, Y. and Karev, G. (2002). The structure of the protein universe and genome evolution. *Nature*. **420**: 218-223.
- Kuper, J., Doenges, C. and Wilmanns, M. (2005). Two-fold repeated ( $\beta\alpha$ )<sub>4</sub>-barrels may provide a molecular tool for dual substrate specificity. *EMBO reports*. **6**: 134-139.
- Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., Sterner, R. and Wilmanns, M. (2000). Structural Evidence for Evolution of the  $\beta/\alpha$  Barrel Scaffold by Gene Duplication and Fusion. *Science*. **289**: 1546-1549.
- Leopoldseder, S., Claren, J., Jürgens, C. and Sterner, R. (2004). Interconverting the Catalytic Activities of ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel Enzymes from Different Metabolic Pathways: Sequence Requirements and Molecular Analysis. *J.Mol. Biol.* **337**: 871-879.
- Leopoldseder, S., Hettwer, S. and Sterner, R. (2006). Evolution of Multi-Enzyme Complexes: The Case of Tryptophan Synthase. *Biochemistry*. **45**: 14111-14119.
- Livesay, D. and La, D. (2006). The evolutionary origins and catalytic importance of conserved electrostatic networks within TIM-barrel proteins. *Protein Science*. **14**: 1158-1170.
- Ma, B.G., Chen L.L. and Zhang, H.Y. (2007). What Determines Protein Folding Type? An Investigation of Intrinsic Structural Properties and its Implications for Understanding Folding Mechanisms. *Journal of Molecular Biology*. **370**: 439-448.
- Maxwell, K.L., Mittermaier, A.K., Forman-Kay, J.D. and Davidson, A.R. (1999). A simple in vivo assay for increased protein solubility. *Protein Science*. **8**: 1908-1911.
- Miles, E.W., Rhee, S. and Davies, R. (1999). The molecular Basis of Substrate Channeling. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**: 12193-12196.

- Morel, N. and Massoulié, J. (2000). Comparative Expression of Homologous Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**: 7304-73012.
- Morett, E., Korbel, J., Rajan, E., Saab-Rincón, G., Olvera, L., Olvera, M., Schmidt, S., Snel, B. and Bork, P. (2003). Systematic discovery of analogous enzymes in thiamin biosynthesis. *Nature Biotechnology*. **21**: 790-795.
- Morris, J.A. and McIvor, R.S. (1994). Saturation mutagenesis at dihydrofolate reductase codons 22 and 31. A variety of amino acid substitutions conferring methotrexate resistance. *Biochem Pharmacol.* **7**: 1207-1220.
- Nagano, N., Orengo, C.A. and Thornton, J. (2002). One Fold with Many Functions: The Evolutionary Relationships between TIM Barrel Families Based on their Sequences, Structures and Functions. *Journal of Molecular Biology*. **321**:741-755.
- Nishio, K., Morimoto, Y., Ishizuka, M., Ogasahara, K., Tsukihara, T. and Yutani, K. (2005). Conformational Changes in the  $\alpha$ -Subunit Coupled to Binding of the  $\beta_2$ -Subunit of Tryptophan Synthase from *Escherichia coli*: Crystal Structure of the Tryptophan Synthase  $\alpha$ -Subunit Alone. *Biochemistry*. **44**: 1184-1192.
- O'Brien, P.J. and Herschlag, D. (1999). Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chemistry and Biology*. **6**: R91-R105.
- Orengo, C., Todd, A.E. and Thornton, J.M. (1999). From protein structure to function. *Current Opinion in Structural Biology*. **9**: 374-382.
- Ostermeier, M., Shim, J.H. and Benkovic, S.J. (1999). A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nature Biotechnology*. **12**: 1205-1209.
- Pan, H., Raza, A.S. and Smith, D.L. (2004). Equilibrium and kinetic folding of rabbit muscle triosephosphate isomerase by hydrogen exchange mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology*. **336**: 1251-1263.
- Park, H., Nam, S., Lee, J., Yoon, C., Mannervik, B., Benkovic, S. and Kim, H. (2006). Design and Evolution of New Catalytic Activity with an Existing Protein Scaffold. *Science*. **311**: 535-538.
- Patrick, W. and Blackburn, J. (2005). In vitro selection and characterization of a stable subdomain of phosphoribosylanthranilate isomerase. *The FEBS Journal*. **272**: 3684-3697.
- Peapus, D.H., Chiu, H.J., Campobasso, N., Reddick, J.J., Begley, T.P. and Ealick, S.E. (2001). Structural characterization of the enzyme-substrate, enzyme-intermediate, and enzyme-product complexes of thiamin phosphate synthase. *Biochemistry*. **40**: 10103-10114.
- Pelletier, J. and Lortie, R. (2007). Sequence-activity relationships guide directed evolution. *Nature Biotechnology*. **25**: 297-298.
- Priestle, J., Grütter. M., White, J., Vincent, M., Kania, M., Wilson., Jardetzky, T., Kirschner, K. and Jansonius, J. (1987). Three-dimensional structure of the bifunctional enzyme N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase-indole-3-glycerol-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 5690-5694.
- Raboni, S., Bettati, S., Mozzarelli, A. (2005). Identification of the Geometric Requirements for Allosteric Communication between the  $\alpha$ - and  $\beta$ -Subunits of Tryptophan Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**: 13450-13456.
- Raushel, F., Thoden, J. and Holden, H. (2003). Enzymes with Molecular Tunnels. *Acc. Chem. Res.* **36**: 539-548.

- Robben, J., Van der Schueren J. and Volckaert, G. (1993). Carboxyl Terminus Is Essential for Intracellular Folding of Chloramphenicol AcetylTransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. **268**: 24555-24558.
- Saab, G., Mancera, E., Montero, G., Sánchez, F., Soberón, X. (2005). Generation of variability by in vivo recombination of halves of a ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel protein. *Biomolecular Engineering*. **22**: 113-120.
- Saab-Rincón, G., Juárez, V.R., Osuna, J., Sánchez, F. and Soberón, X. (2001). Different strategies to recover the activity of monomeric triosephosphate isomerase by directed evolution. *Protein Engineering*. **14**: 149-155.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., editors. (1989) Molecular Cloning. A laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sblattero, D. and Bradbury, A. (2000). Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nature Biotechnology*. **18**: 75-80.
- Schmidt, D., Mundorff, E., Dojka, M., Bermudez, E., Ness, J., Govindarajan, S., Babbit, P., Minshull, J. and Gerlt, J. (2003). Evolutionary Potential of ( $\beta$ - $\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrels: Functional Promiscuity Produced by Single Substitutions in the Enolase Superfamily. *Biochemistry*. **42**: 8387-8393.
- Seitz, T., Bocola, M., Claren, J. and Sterner, R. (2007). Stabilization of a ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Protein Designed from Identical Half Barrels. *Journal of Molecular Biology*. **372**: 114-129.
- Sieber, V. (2003). Selection for soluble proteins via fusion with Chloramphenicol Acetyltransferase. *Methods Mol. Biol.* **230**: 45-55.
- Soberón, X., Fuentes-Gallego, P. and Saab-Rincón, G. (2004). In vivo fragment complementation of a (beta/alpha)(8) barrel protein: generation of variability by recombination. *FEBS letters*. **560**: 167-172.
- Stemmer, W.P. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Scie USA*. **91**: 10747-51.
- Sterner, R. and Höcker, B. (2005). Catalytic Versatility, Stability and Evolution of the ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel Enzyme Fold. *Chem. Rev.* **105**: 4038-4055.
- Taverna, D. and Goldstein, R.A. (2002). Why Are Proteins So Robust To Site Mutations?. *Journal of Molecular Biology*. **315**: 479-484.
- Tawfik, D. S. (2006). Loop Grafting and the Origins of Enzymes Species. *Science*. **311**
- Taylor, S., Kast, P. and Hilvert, D. (2001). Investigating and Engineering Enzymes by Genetic Selection. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 3310-3335.
- Theobald, D. and Wuttke, D. (2005). Divergent Evolution Within Protein Superfolds Inferred from Profile-based Phylogenetics. *Journal of Molecular Biology*. **354**: 722-737.
- Thornton, J., Orengo, C.A., Todd, A.E. and Pearl, F.M.G. (1999). Protein Folds, Functions and Evolution. *Journal of Molecular Biology*. **293**: 333-342.
- Urfer, R. and Kirschner, K. (1992). The importance of surface loops for stabilizing an eightfold {beta}-{alpha} barrel protein *Protein Science*. **1**: 31-45.
- Vadrevu, R., Falzone, C. and Matthews, R. (2003). Partial NMR assignments and secondary structure mapping of the isolated  $\alpha$  subunit of Escherichia coli tryptophan synthase, a 29-kD TIM barrel protein. *Protein Science*. **12**: 185-191.
- Vega, M.C., Lorentzen, E., Linden, A. and Wilmanns, M. (2003). Evolutionary markers in the ( $\beta/\alpha$ )-barrel fold. *Current Opinion in Chemical Biology*. **7**: 694-701.

- Watson, J.D., Laskowski, R.A. and Thornton, J. (2005). Predicting protein function from sequence and structural data. *Current Opinion in Structural Biology*. **15**: 275-284.
- Weeks, A., Lund, L. and Raushel, F. (2006). Tunneling of intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Current Opinion in Chemical Biology*. **10**: 465-472.
- Wierenga, R. K. (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters*. **492**: 193-198.
- Wilmanns, M., Hyde, C.C., Davies, D.R., Kirschner, K. and Jansonius, N. (1991). Structural Conservation in Parallel  $\beta/\alpha$ -Barrel Enzymes That Catalyze Three Sequential Reactions in the Pathway of Tryptophan Biosynthesis. *Biochemistry*. **30**: 9161-9169.
- Wise, L.E. and Rayment, I. (2004). Understanding the Importance of Protein Structure to Nature's Routes for Divergent Evolution in TIM Barrel Enzymes. *Acc. Chem. Res.* **37**: 149-158.
- Xia, Y. and Levitt, M. (2004). Simulating protein evolution in sequence and structure space. *Current Opinion in Structural Biology*. **14**: 202-207.
- Xie, G., Keyhani, N., Bonner, A and Jensen, R. (2003). Ancient Origin of the Tryptophan Operon and the Dynamics of Evolutionary Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67**: 303-342.
- Yang, L.H., Ahmed, A. and Miles, E. (1996). PCR Mutagenesis and Overexpression of Tryptophan Synthase from *Salmonella typhimurium*: On the Roles of  $\beta_2$  Subunit Lys-382. *Protein Expression and Purification*. **8**: 126-136.
- Yoshikuni, Y., Ferrin, T. and Keasling, J. (2006). Designed divergent evolution of enzyme function. *Nature*. **440**: 1078-1082.
- Yuan, L., Kurek, I., English, J. and Keeman, R. (2005). Laboratory-Directed Protein Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **69**: 373-392.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A. and Arnold, F.H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotechnology*. **3**: 258-261.
- Zitzewitz, J.A. and Matthews, C.R. (1999). Molecular Dissection of the Folding Mechanism of the  $\alpha$ -Subunit of Tryptophan Synthase: An Amino-Terminal Autonomous Folding Unit Controls Several Rate-Limiting Steps in the Folding of a Single Domain Protein. *Biochemistry*. **38**: 10205-1021

## Servidores Web

<http://www.ebi.ac.uk/>

<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/>

<http://expasy.org/>

<http://ecocyc.org/>