

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Biotecnología
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

**Identificación de los Determinantes Moleculares que Median la
Bifuncionalidad en PriA de *Streptomyces coelicolor***

**Tesis que para obtener el grado
de maestro en ciencias**

p r e s e n t a :

Ing. Lianet Noda García

Director de Tesis:
Dr. Francisco Barona Gómez

Cuernavaca, Morelos. 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Para mi familia, la fuente de toda constancia en mi vida. Quien soy es el reflejo de lo que quisieron que fuera, espero que esta persona que he construido a partir de sus ideales los haga sentir orgullosos y felices. Made, Mami y Papi, muchas gracias por todo, los amo.

Agradecimientos

A Paco (padre o tutor), por aceptarme como miembro de su grupo. Pertenecer a este maravilloso grupo de investigación ha impactado para siempre mi vida académica. Toda la motivación y apoyo que he recibido, todas las discusiones, han fomentado lo que considero ha sido el mayor crecimiento personal que he experimentado. Muchas gracias por formar parte activa de mi formación académica, pero principalmente por ofrecerme tu amistad.

A los miembros del comité tutorial, Drs. Enrique Morett y Brenda Valderrama, por los comentarios y sugerencias que orientaron la realización de la presente tesis.

A los miembros de los laboratorios de Xavier Soberón y Enrique Morett, en especial a Filiberto Sánchez, por todo el apoyo que me ofrecieron durante los últimos dos años.

A los Drs. Vilmos Fülöp y Helena Wright, y a los miembros del laboratorio de Biología Estructural en la Universidad de Warwick, por permitirme realizar una estancia en este laboratorio y por todo el apoyo que me ofrecieron durante la realización de los experimentos de cristalografía.

Al CONACYT y la UNAM, por otorgarme el financiamiento, sin el cual la realización de esta tesis hubiera sido imposible.

A mi familia, la de México, porque funge como tal, y a la de Cuba. Gracias por el constante ánimo y apoyo que me brindan.

A mis amigos, los viejos y los nuevos, sin su constante presencia en mi vida todo hubiera sido gris, y el tiempo transcurrido no hubiera sido tan ameno.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Adquisición de mutaciones y su efecto en la evolución de nuevas funciones enzimáticas	1
1.2. Evolución de la función enzimática en el contexto metabólico	2
1.2.1. Evolución retrógrada y la aparición de suprafamilias	3
1.2.2. Evolución siguiendo el modelo del mosaico y la aparición de superfamilias	4
1.2.3. Relaciones evolutivas y mecánicas entre suprafamilias	5
1.3. Evolución y regulación de las rutas biosintéticas de los aminoácidos histidina y triptofano	6
1.4. Barriles ($\beta\alpha$) ₈	7
1.4.1. Estructura terciaria de los barriles ($\beta\alpha$) ₈	8
1.4.2. Función de las enzimas ($\beta\alpha$) ₈	10
2. Antecedentes	13
2.1. PriA	13
2.1.1. Descubrimiento de PriA	13
2.1.2. Función enzimática de PriA	15
2.1.3. Estructura tridimensional de PriA	16
2.2. Evolución y dinámica de los genes <i>trp</i> en actinomicetos	17
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo General	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. Hipótesis	22
5. Justificación	23
6. Materiales y Métodos	24
6.1. Construcción de filogenias	24
6.2. Simulaciones de acoplamiento proteína – ligando “ <i>docking</i> ” de PriA	25
6.3. Generación de mutaciones puntuales	25
6.4. CoFi (<i>Colony Filtration</i>) Blot	28

6.5.	Ensayos de complementación	29
6.6.	Caracterización funcional y estructural de PriA y mutantes	30
	6.6.1. Determinación de parámetros cinéticos de la actividad TrpF en PriA y mutantes	30
	6.6.2. Expresión e inducción	31
	6.6.3. Purificación	32
	6.6.4. Cristalización	33
	6.6.5. Reemplazo molecular y afinamiento	33
7.	Resultados y Discusión	35
7.1.	Establecimiento de la relación estructura/función de PriA.	35
	7.1.1. Sitio activo de PriA	36
	7.1.2. Doble especificidad de sustrato de PriA	39
	7.1.3. Switch molecular para modular la bifuncionalidad de PriA	40
7.2.	Comparaciones entre PriA y Neo-HisA	41
	7.2.1. Posible naturaleza evolutiva de los trece reemplazos	43
	7.2.2. Explorando residuos involucrados en la bifuncionalidad de PriA	45
	7.2.3. Rol de la epistasis en el proceso evolutivo de PriA	49
	7.2.4. Caracterización bioquímica de PriA y mutantes puntuales	51
	7.2.5. Caracterización estructural de PriA y mutantes	54
8.	Conclusiones	60
9.	Perspectivas	61
10.	Referencias	62
11.	Anexos	69
11.1.	Preparación de Soluciones y Medios de Cultivo	69
11.2.	Condiciones de PCR para construir las mutantes de PriA	70
11.3.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los actinomicetos seleccionados.	72
11.4.	Actinomicetos utilizados para la caracterización filogenética de PriA y las claves utilizadas para representarlos en los filogramas.	75

11.5. Resultados de ProTest	76
11.6. Cristales de las mutantes T29K (A) y R139N (B)	79
11.7. Patrones de difracción en casa de los cristales de las diferentes mutantes de PriA	80

Abstract

The lack of a *trpF* gene (tryptophan biosynthesis) in several actinomycetes led to the discovery of a bi-functional enzyme homologous to *hisA* (histidine biosynthesis). This HisA homologue was renamed phosphoribosyl isomerase A (PriA) for its generalized function in the biosynthesis of both histidine and tryptophan. Comparative genomic analyses of actinomycetes showed the occurrence of a *trp/his* cluster in most of the studied microorganisms. However, this is not the case for some species belonging to the *Corynebacterium* genus, where the existence of an enteric *trp* operon (including a *trpF* gene), acquired by lateral gene transfer, was detected. This study aimed to elucidate the catalytic mechanism of PriA from the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*, with an emphasis on its dual substrate specificity, by comparing it at the sequence and structural level with homologous mono-functional HisA enzymes. These results will allow the complete functional characterization of PriA. A sequence alignment between PriA / HisA homologues pinpointed 13 residues that are different between them, suggesting the functional involvement of these residues in the dual substrate specificity. Independent site-directed mutagenesis mimicking these naturally occurring replacements were done on the *priA* gene, and X-ray crystallographic experiments leading to the structural elucidation of the mutants, were performed. Results revealed unique loop recognition and binding sites for each substrate, despite the presence of a shared active site cavity. Furthermore, residues accounting for PriA's catalytic mechanism enabling it to achieve its bifunctionality were identified. The functional and structural characterization of PriA will allow the future development of drugs against this protein, present in bacterial pathogens as *M. tuberculosis*.

Resumen

La falta del gen *trpF* (biosíntesis de triptófano) en el genoma de ciertos actinomicetos, llevó al descubrimiento de un homólogo de *hisA* (biosíntesis de histidina), capaz de llevar a cabo ambas actividades. Este homólogo fue renombrado PriA (del inglés *phosphoribosyl isomerase*), nombre que refleja su actividad general como isomerasa, sobre los sustratos PRA y ProFAR, en sus actividades de TrpF y HisA, respectivamente. La publicación de más de 40 genomas de actinomicetos permitió llevar a cabo comparaciones entre los genes *his* y *trp* de estos microorganismos. Se encontró que la mayoría de los actinomicetos presentan estos genes agrupados, formando un “cluster”, y que la ausencia del gen *trpF* en el genoma es recurrente. Una excepción a esta regla está representada por algunas corinebacterias (*C. glutamicum* y *C. diphtheriae*), las cuales han adquirido mediante un proceso de transferencia horizontal, un operón *trp* proveniente de una enterobacteria. Esta observación dio lugar a la hipótesis de que los homólogos de PriA presentes en estas corinebacterias, en las cuales el cluster *his/trp* muestra evidencia de la decadencia, han perdido su bifuncionalidad; situación que fue comprobada experimentalmente. Esta tesis tiene como objetivo general entender el mecanismo de acción por el cual PriA lleva a cabo dos actividades. Para esto, se compararon las secuencias de HisA, PriA y neo-HisA. Este trabajo reporta la caracterización funcional y estructural de mutantes de PriA construidas tras este acercamiento. Las comparaciones estructurales y de secuencia entre HisA y PriA permitieron identificar los residuos catalíticos y de unión a sustrato de PriA. Mientras que las comparaciones de secuencia entre PriA y neoHisA dio como resultado la identificación de 13 residuos, cuyo papel funcional como mediadores de la bifuncionalidad de PriA fue comprobado. La existencia de HisA, PriA y neo-HisA, representa el único ejemplo evolutivo natural de enzimas bifuncionales y mono-funcionales cercanas en secuencia y con relevancia fisiológica. Por tal motivo, continuar el estudio del proceso evolutivo que se llevó a cabo entre estas sub-familias podría ser de gran relevancia para

entender los procesos de adquisición de mutaciones importantes para la migración de la función enzimática.

1. Introducción

1.1. Adquisición de mutaciones y su efecto en la evolución de nuevas funciones enzimáticas

El enriquecimiento de las funciones celulares está estrechamente relacionado con la generación de nuevas actividades enzimáticas y el surgimiento de nuevas vías metabólicas, mismas que permiten a una célula adaptarse a cambios en el medio ambiente. Durante este proceso evolutivo el contenido genómico suele aumentarse, permitiendo de esta manera la generación y posterior especialización de nuevas funciones celulares.

En los años treinta se planteó que la aparición de nuevos genes puede llevarse a cabo por mecanismos de duplicación génica ¹. Sin embargo, no fue hasta 1970 en que Ohno propuso una teoría que potencialmente explica los mecanismos mediante los cuales pueden aparecer nuevos genes por duplicación y evolucionar dentro de la célula. La teoría de Ohno propone que, después de la duplicación génica, una de las copias se encuentra liberada de la selección negativa o purificadora (presión por mantener la misma función) y por tal motivo puede acumular mutaciones, que en el contexto original hubieran ocasionado efectos deletéreos en la función enzimática primaria ². El destino de la nueva copia es todavía un tema sumamente discutido, principalmente porque la mayoría de las mutaciones en las proteínas tienen un efecto negativo en su estabilidad y función ³. A pesar de la alta probabilidad de que la nueva copia adquiera mutaciones deletéreas y termine en la formación de pseudogenes^{1 4}, la existencia de parálogos^{2 5} en los genomas actuales es evidencia de que la adquisición de nuevos genes es precedida por un proceso de duplicación ⁶.

¹ Genes no funcionales que pueden o no provenir de un evento de duplicación génica.

² Genes homólogos, es decir, comparten un mismo ancestro, que aparecen a consecuencia de un evento de duplicación génica, y no de especiación; los genes parálogos suelen estar codificados por un mismo genoma, aunque se encuentran excepciones.

¿Cómo es entonces que a través de la adquisición de mutaciones puntuales se obtienen nuevas funciones enzimáticas? Existen dos teorías que intentan explicar el proceso de adquisición de las mismas. La primera propone que tras el proceso de duplicación se fijan una serie de mutaciones neutrales, dando origen a una nueva función enzimática. La nueva función posteriormente será incrementada y especializada mediante selección positiva ⁷. La segunda teoría propone que precedente al proceso de duplicación, además de su función original, la enzima tiene una función promiscua adquirida por mutaciones neutrales, después del proceso de duplicación, la actividad promiscua adquiere relevancia fisiológica, razón por la cual la nueva copia es fijada mediante selección positiva ^{8; 9; 10; 11}. Debido a que los dos escenarios contemplan un proceso de selección positiva, ambos son congruentes con datos experimentales que muestran un incremento en la tasa de mutación³ de los genes duplicados ⁹. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que, en caso de existir una función promiscua, no sólo las mutaciones fijadas bajo selección positiva resultan en el incremento de la nueva función. En dicho escenario, la adquisición de mutaciones neutrales es suficiente para cambiar la red de interacciones entre residuos en la proteína y favorecer la ocurrencia y fijación de mutaciones que llevarán a la especialización de las funciones ^{12; 13}. De esta forma, pareciera que las funciones promiscuas sirven como material evolutivo para la aparición de nuevas enzimas.

1.2. Evolución de la función enzimática en el contexto metabólico

Existen principalmente dos teorías que intentan dar explicación al proceso evolutivo por el cual las rutas metabólicas, y por ende las nuevas actividades enzimáticas han divergido. En la figura 1.1 se indican esquemáticamente los conceptos que le dan soporte a estas dos teorías que

³ La tasa de mutación es medida como el número de mutaciones no sinónimas.

se explican con detalle a continuación, debido a la gran relevancia que tienen para el entendimiento de la presente tesis.

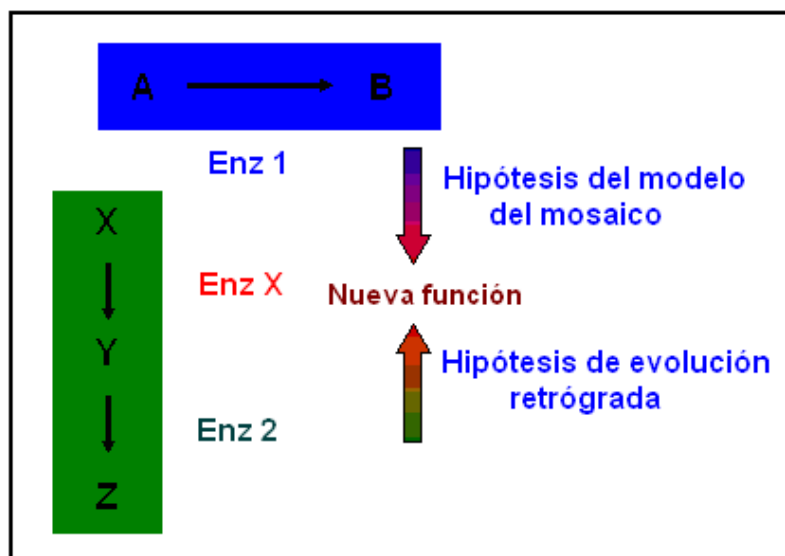


Figura 1.1. Modelos de evolución metabólica. La enzima X, que debe llevar a cabo una nueva función, bien puede surgir por duplicación genética a partir de la enzima siguiente en la ruta metabólica (Enz 2) (evolución retrógrada) o a partir de una enzima de otra ruta (Enz 1), que lleve a cabo una conversión enzimática similar sobre sustratos análogos pero diferentes (modelo del mosaico). Figura adaptada de ¹⁴.

1.2.1. Evolución retrógrada y la aparición de suprafamilias

La teoría de evolución retrógrada surge de la idea propuesta por Horowitz en 1945 para dar respuesta a la aparición de vías metabólicas en la sopa prebiótica. Una implicación de esta teoría es que las nuevas enzimas pudieran ser reclutadas de la misma ruta metabólica, manteniendo éstas en común la afinidad por cierto sustrato o producto, y evolucionando el mecanismo de reacción ¹⁵. En consecuencia, esto da lugar a la existencia de enzimas que pueden ser agrupadas funcionalmente en suprafamilias, las cuales incluyen enzimas homólogas que catalizan reacciones diferentes, sin atributos mecánicos comunes, en las cuales suele estar conservada la posición tridimensional de los residuos catalíticos ¹⁶.

Dos ejemplos muy relevantes para el presente trabajo se encuentran en las suprafamilias que incluyen a las enzimas que participan en la biosíntesis de triptofano e histidina. La biosíntesis del triptofano es llevada a cabo por cinco enzimas que forman este producto a partir del intermediario corismato¹⁷. Resulta interesante que, tres de estas enzimas, TrpC, indol-3-glicerol fosfato (InGP, de sus siglas en inglés) sintasa (EC 4.1.1.48); TrpF, fosforribosil antranilato (PRA, de sus siglas en inglés), isomerasa (EC 5.3.1.24); y TrpA, subunidad alfa de la triptofano sintetasa (EC 4.2.1.20A) presentan la misma topología estructural: barriles ($\beta\alpha$)₈ (ver sección 1.3)¹⁸. Estas enzimas son consecutivas en la ruta metabólica, e incluso en algunas bacterias como en *E. coli*, TrpF y TrpC se expresan desde el mismo marco de lectura formando una sola proteína con dos dominios¹⁷. Un ejemplo similar puede ser encontrado en la biosíntesis de la histidina. En este caso, las enzimas HisA, ribonucleótido *N*-[5'-fosforribosil formiminol]-5-imidazolamina-4-carboxiamino (ProFAR, de sus siglas en inglés) isomerasa, (EC 5.3.1.16) y HisF, imidazol-glicerol-fosfato (ImGP, de sus siglas en inglés) ciclasa (EC 4.1.3.-) también actúan de manera consecutiva dentro de la ruta metabólica, y ambas son barriles ($\beta\alpha$)₈¹⁹.

Dado que ni TrpC/TrpF/TrpA ni HisA/HisF, comparten entre sí el mecanismo de reacción, pertenecen a la misma ruta metabólica y sus sustratos son muy parecidos, cumplen con la norma de las suprafamilias. Por tal motivo, se ha especulado que la existencia de estas enzimas es el resultado de un proceso de duplicación génica dentro del marco del modelo de evolución retrógrada¹⁶.

1.2.2. Evolución siguiendo el modelo del mosaico y la aparición de superfamilias

La segunda teoría la propone Jensen en 1976 y es denominada modelo “mosaico” o del reclutamiento; una implicación de esta teoría es la aparición

de una nueva enzima, o reclutamiento, según su capacidad catalítica, la cual es retenida, mientras evoluciona su especificidad de sustrato ²⁰. Esta teoría es consistente con el agrupamiento de enzimas homólogas en superfamilias, cuya existencia es la más clara evidencia de la promiscuidad de la catálisis enzimática ²¹. A pesar de que esto último fue reconocido desde los años setenta, el concepto de superfamilias no fue formalizado hasta recientemente, cuando en el año 2001, Gerlt y Babbitt publicaron una revisión que dio lugar a una clasificación enzimática, basada en el mecanismo de reacción, es decir, en la función enzimática. Estos investigadores definen el término superfamilia como aquel grupo de enzimas homólogas que catalizan, bien la misma reacción química con diferentes especificidades de sustrato, o bien diferentes reacciones que comparten entre sí algunos atributos mecanísticos, llevados a cabo por residuos en el sitio activo que funcionan de la misma manera en todos los miembros de la superfamilia. Al momento de la publicación de dicha revisión existían seis superfamilias clasificadas: enolasa; amidohidrolasa/fosfotriesterasa; de radical tiol; crotonasa; oxidasas/oxigenasas Fe-dependientes; y quelantes de oxígeno contiguo (del inglés *vicinal-oxygen-chelate*).

1.2.3. Relaciones evolutivas y mecanísticas entre suprafamilias

En este contexto, el ejemplo más relevante para la presente tesis lo representan las enzimas HisA y TrpF. Estas enzimas llevan a cabo el mismo mecanismo de reacción centrado en una catálisis ácido/base que involucra un intermediario imino o base de Schiff ²². Basados en la observación anterior, Sterner y colaboradores seleccionaron a HisA de *Thermotoga maritima* para realizar experimentos de evolución dirigida con la finalidad de obtener la actividad TrpF; aunque estos experimentos fueron exitosos, la actividad TrpF evolucionada resulta sumamente baja, e involucra la modificación del residuo catalítico Asp127, al cual se le ha atribuido el rol de ácido general ²³. Sin embargo, la enzima evolucionada perdió su actividad de

HisA y el objetivo fundamental de obtener una enzima bifuncional no se logró.

1.3. Evolución y regulación de las rutas biosintéticas de los aminoácidos histidina y triptofano

Debido a que todas las eubacterias, arqueobacterias y algunos eucariontes contienen los genes para sintetizar triptofano e histidina, se ha sugerido que ambas rutas metabólicas pueden ser ancestrales y su existencia ha sido remitida al último ancestro común de los seres vivos. Por ello, ambas rutas metabólicas han sido estudiadas exhaustivamente, permitiendo establecer reglas generales acerca de la regulación y evolución de los genes involucrados ^{24; 25}. Algunas bacterias como *E. coli* contienen agrupados, en uno o dos operones, los genes que llevan a cabo la biosíntesis de la histidina y el triptofano ^{26; 27}. En ambos casos, la expresión de los genes está estrechamente regulada por los niveles intracelulares de estos aminoácidos, mediante un proceso de inhibición por producto ^{26; 28}. Sin embargo, se han encontrado varias excepciones, tanto en términos de la organización de los genes dentro de los operones, como en la inexistencia de los mismos ^{24; 25}. Específicamente, se hará referencia a los detalles de las rutas metabólicas de triptófano e histidina en los actinomicetos, bacterias en las cuales fue descubierta la proteína que es el objetivo de estudio del presente trabajo.

Los actinomicetos son bacterias Gram + con alto contenido de (G+C) en sus genomas, en su mayoría lineales. En la familia están clasificados más de 100 géneros diferentes, de los cuales encontramos algunos patógenos como: *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Actinomyces*, y otros que han sido ampliamente estudiados, debido a su importancia industrial como: *Bifidobacterium*, *Corynebacterium* y *Streptomyces* ²⁹. El microorganismo *Streptomyces coelicolor*, cepa A3(2), ha servido como modelo para extrapolar los resultados

obtenidos hacia el resto de los actinomicetos ^{30; 31}. Aunado a esto, la existencia de más de 35 genomas de actinomicetos ha permitido acrecentar el conocimiento sobre este grupo de bacterias.

En los actinomicetos, los genes de las rutas biosintéticas de los aminoácidos triptofano e histidina se encuentran conservados en el mismo locus (o cluster) formando un bloque de sintenia localizado en el centro del genoma ¹⁴ (ver Figura 2.4 más adelante). Sin embargo, no ha sido encontrada o descrita previamente alguna secuencia regulatoria específica para este grupo de bacterias ²⁷. Por tal motivo, la expresión de estos genes es constitutiva y dependiente de la fase y tasa de crecimiento, y no así de los niveles intracelulares de estos aminoácidos ^{32; 33; 34}.

1.4. Barriles ($\beta\alpha$)₈

A continuación se explicarán detenidamente los atributos estructurales y funcionales referentes al plegamiento ($\beta\alpha$)₈, debido a que TrpF y HisA lo adoptan, y a la gran relevancia que estas enzimas tienen para el presente trabajo.

La estructura tridimensional de barriles ($\beta\alpha$)₈ fue reportada por primera vez en la enzima triosa fosfato isomerasa (TIM, EC 5.3.1.1), la cual cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehído-3 fosfato en la vía glicolítica, razón por la cual este tipo de plegamiento es también denominado barril TIM ³⁵. A partir de la elucidación estructural de la TIM, y con el paso de los años, ha resultado claro que el plegamiento ($\beta\alpha$)₈ representa la estructura tridimensional más abundante dentro del universo de las proteínas. Hasta febrero de 2005, en la base de datos “Clasificación Estructural de Proteínas” se encontraban cerca de 378 barriles ($\beta\alpha$)₈ diferentes, lo que representa el 10% de todas las proteínas con una estructura tridimensional conocida ³⁶. Actualmente, en la base de datos

CATH ³⁷ se han clasificado 1028 estructuras con plegamiento $(\beta\alpha)_8$ ³⁸. Debido a la prominencia de este plegamiento existe una gran cantidad de bibliografía sobre este tipo particular de proteínas; de hecho, el número inigualable de datos de estructura y función generado sobre este plegamiento, hace de los barriles $(\beta\alpha)_8$ un modelo idóneo para el estudio general de los procesos evolutivos ³⁶.

1.4.1. Estructura terciaria de los barriles $(\beta\alpha)_8$

Los barriles $(\beta\alpha)_8$ contienen aproximadamente 250 residuos de aminoácidos, conteniendo los más pequeños más de 200 residuos. Pueden ser enzimas muy pequeñas, monoméricas, y con un solo dominio, o enzimas polipeptídicas, como la β -galactosidasa, que es tetramérica ³⁹. Terciariamente, los barriles $(\beta\alpha)_8$ están compuestos por 8 subunidades (Figura 1.2.a), cada una de las cuales tiene una hoja β y una hélice α , orientadas de manera antiparalela. Las 8 hojas β forman un barril canónico central rodeado por las hélices α . Las cadenas se encuentran inclinadas 36° con respecto al eje principal del barril. Dos parámetros estructurales son importantes para definir un barril, el valor n que se refiere al número de cadenas del barril, y el valor s (del inglés *shear*) que corresponde al valor en que se desplaza el inicio de las hojas β de la posición +1. Todos los barriles $(\beta\alpha)_8$ son $n=8$ y $s=8$, además de ser el único plegamiento tipo barril que posee todas las hojas β orientadas paralelamente ³⁶.

Dentro del barril, las cadenas laterales de los residuos de las hojas β tienen una orientación específica (Figura 1.2.c). Las cadenas laterales de los residuos de las hojas β impares (1, 3, 5 y 7) apuntan hacia el interior del barril, mientras que las cadenas laterales de los residuos de las hojas β pares (2, 4, 6 y 8), apuntan hacia afuera, provocando una simetría tetraédrica alrededor del eje del barril ³⁹. En todos los barriles $(\beta\alpha)_8$, los residuos que forman el sitio activo se encuentran en la mitad

correspondiente al extremo carboxilo de las hojas β , denominada cara catalítica (Figura 1.2.b), a la cual corresponden principalmente las asas $\beta \rightarrow \alpha$, las cuales pueden ser de un largo muy variable (15 – 113), y en algunos casos formar estructuras secundarias o dominios diferentes, como es el caso del asa $\beta \rightarrow \alpha$ 3 de la enzima piruvato cinasa, que posee una longitud de 113 residuos, en los cuales contiene diversas estructuras secundarias ⁴⁰.

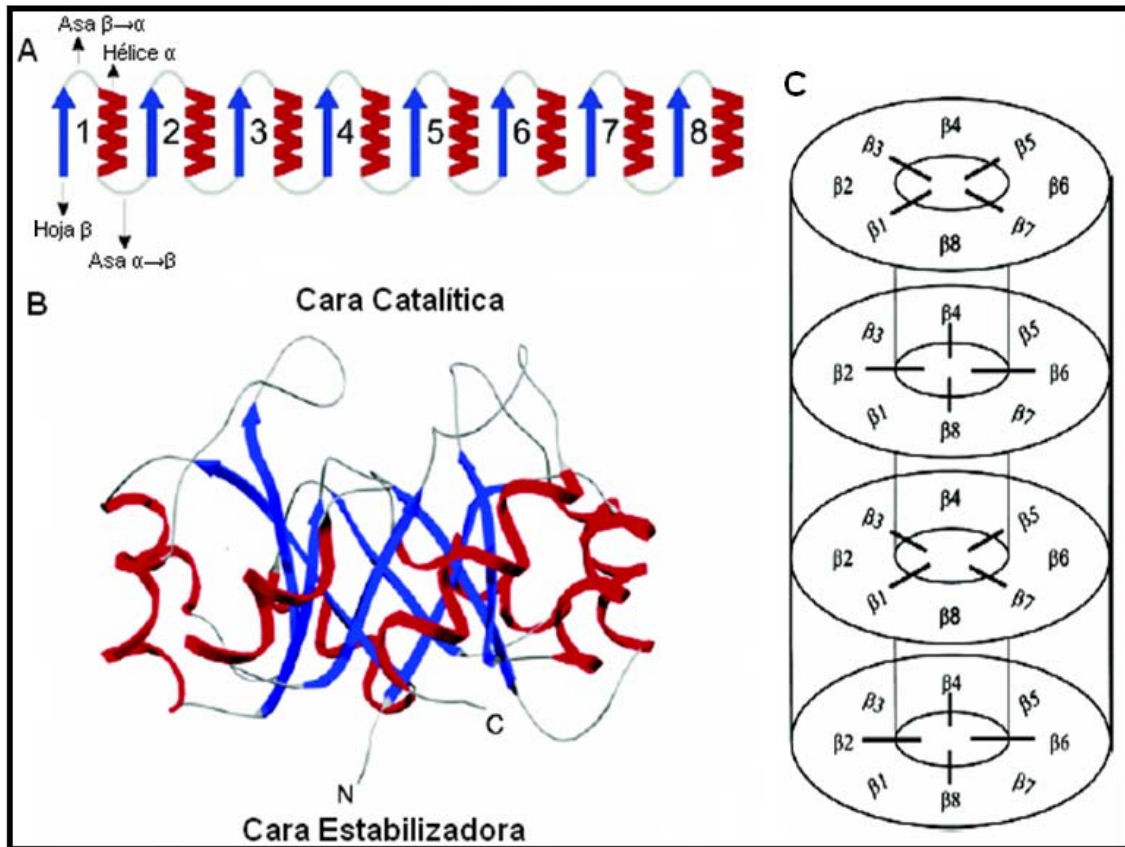


Figura 1.2. Estructura de los barriles $(\beta\alpha)_8$ (A) Representación esquemática de la estructura secundaria del barril. (B) Esquema de la estructura tridimensional de un barril formado por las hojas β rodeada por las hélices α (C) Esquema de la estructura tetraédrica formada por las hojas β del barril central (Figura tomada de la referencia ³⁶).

Mientras que las asas $\beta \rightarrow \alpha$ son muy importantes para la función, la otra mitad de la molécula, donde se encuentran las asas $\alpha \rightarrow \beta$ y parte del núcleo, proporcionan la estabilidad al barril. Esta división estructural le permite a la enzima variar la función sin comprometer la estabilidad proteica, explicando en parte su versatilidad funcional, que ha sido explotada exitosamente en experimentos de evolución dirigida ^{36; 39}. En este

mismo sentido, se considera que el plegamiento tipo $(\beta\alpha)_8$ no está determinado por la secuencia de aminoácidos, sino por características generales, como la distribución de los residuos polares y no polares, o residuos con carga ³⁸. Por ejemplo, hasta un 90% de los residuos de proteínas homólogas y funcionalmente idénticas, pueden ser diferentes. Tal es el caso en las N-succinil aminoácido racemasa, en donde la baja identidad de secuencia entre los ortólogos representa un problema para su correcta identificación ⁴¹. Notablemente, dentro de las familias de enzimas poco divergentes, las diferencias se encuentran principalmente en las asas, mientras que la estructura del núcleo del barril es más susceptible a cambios ⁴².

Los 1028 barriles $(\beta\alpha)_8$ encontrados se pueden dividir estructuralmente en 18 familias. Siete de estas familias poseen solo un miembro que las representa, mientras que en la familia más grande, a donde pertenecen las glicosidasas, se encuentran 22 números de la comisión de enzimas (EC) diferentes (la mayoría de estos comienza con 3.2.1), razón por la cual el grupo de Orengo sugiere dividirlos en cuatro subfamilias: alfa-amilasas, endoglucanasas, quitinasas y quitobiasas ³⁸. De las 18 familias clasificadas, doce de éstas tienen sitios de unión a cofactores como FMN, NADP, PLP o unión a iones metálicos divalentes. Otro motivo recurrente entre las familias es el sitio de unión a fosfato, indispensable para la unión de sustratos o incluso de los mismos cofactores. Este sitio, denominado *phosphate binding site* o PBS por sus siglas en inglés, suele encontrarse conservado en las estructuras secundarias $\beta 7$, $\alpha 7$, y $\beta 8$, e incluso hasta en una hélice $\alpha 8$ ³⁸.

1.4.2. Función de las enzimas $(\beta\alpha)_8$

La mayoría de las proteínas con plegamiento $(\beta\alpha)_8$ son enzimas, con excepción de dos casos reportados. El primero de estos corresponde a la

proteína narbonina, que es una proteína de almacenamiento encontrada en las semillas de algunas leguminosas. La pérdida de actividad enzimática en esta proteína podría estar asociada a algunas diferencias estructurales en el extremo amino terminal, que es distinto cuando se compara, en secuencia y estructuralmente, con homólogos que sí son funcionales ⁴³. El segundo caso reportado corresponde a la proteína conavalina B, con una función bioquímica similar a la de la narbonina, y que se encuentra en las semillas de *Canavalia ensiformis*. Estas dos proteínas tienen una estructura como la de las enzimas hevamina, una proteína de las plantas con actividad de lisozima y quitinasa, con la cual comparten 39% de identidad de secuencia, principalmente en el extremo carboxilo, en donde solamente los residuos involucrados en la catálisis están modificados ⁴⁴.

Fuera de estas dos excepciones, todas las proteínas $(\beta\alpha)_8$ son enzimas y abarcan 5 de los 6 tipos de actividades enzimáticas incluidas en la EC, a excepción de las ligasas. Aunque la mitad de los barriles pertenece al grupo de las hidrolasas, en especial de las glicosidasas, las enzimas $(\beta\alpha)_8$ llevan a cabo 64 reacciones enzimáticas diferentes, 85% de las cuales están involucradas en el metabolismo energético, de macromoléculas o de moléculas pequeñas con algunas excepciones, como transportadores iónicos, o proteínas que intervienen en funciones celulares relativas al DNA o RNA ³⁸.

Utilizando técnicas de evolución dirigida⁴, se ha podido modificar la actividad de ciertos barriles $(\beta\alpha)_8$, como es el caso de la aldolasa responsable de la síntesis del ácido siálico, el cual existe en la naturaleza únicamente en su configuración D. En este caso, se logró modificar la afinidad por el sustrato, de manera que la enzima original dejó de aceptar los sustratos naturales (i.e. piruvato y ácido neuramínico), para evolucionar especificidad por ácido 3-deoxi-mano-2 octulosónico, en su configuración L (L-KDO). El

⁴ Proceso iterativo de evolución llevada a cabo en el laboratorio donde se insertan cambios en una proteína y se seleccionan aquellas variantes que contienen una nueva función deseada.

objetivo de este estudio fue obtener una enzima que produjera ácido siálico en su configuración L, de tal forma que resultara más estable a degradaciones enzimáticas ^{45;} ⁴⁶. La posibilidad de que por técnicas de evolución dirigida se pueda modificar la actividad enzimática de un barril $(\beta\alpha)_8$, sin duda, puede ser considerada como un reflejo de la versatilidad funcional intrínseca a este plegamiento.

2. Antecedentes

2.1. PriA

2.1.1 Descubrimiento de PriA

Con la secuenciación de nuevos genomas, el número de genes cuya función es desconocida ha aumentado significativamente. De la misma manera, se ha acrecentado el número de incongruencias asociadas a la falta de genes (denotados, en inglés, *missing genes*) de cuya función se tiene evidencia experimental, pero se desconoce su secuencia codificante. Tal era el caso del gen *trpF* en el genoma de *S. coelicolor*. Esta observación adquiere relevancia ante el hecho de que este organismo no es un auxótrofo natural para el aminoácido aromático triptofano ⁴⁷.

La búsqueda de posibles candidatos que puedan llevar a cabo la actividad TrpF en *S. coelicolor*, fue abordada tomando en cuenta las ideas evolutivas presentadas en la sección 1.2.1. El primer acercamiento, congruente con la teoría de evolución retrógrada, pretendió encontrar miembros de la misma suprafamilia (ver 1.2.1). La presencia de dos parálogos del gen *trpC* en el genoma de este organismo resultaba alentadora. Sin embargo, para ninguno de los parálogos de *trpC* se encontró evidencia que sugiriera una actividad TrpF ¹⁴. Por tal motivo, se llevó a cabo un segundo acercamiento congruente con la teoría del mosaico. La actividad enzimática de un homólogo de HisA (*Sco2050*) identificado en el genoma de *S. coelicolor* durante su secuenciación fue explorada debido a la sugerencia de que las enzimas HisA y TrpF pertenecen a la misma superfamilia (ver 1.2.2), y a la evidencia de que es posible adquirir la actividad TrpF utilizando a HisA como plataforma para evolución experimental *in vitro* ⁴⁸. La hipótesis que se planteó fue que una sola isomerasa con especificidad de sustrato relajada era responsable de las dos actividades, dentro de un contexto fisiológicamente relevante.

La existencia de dicha enzima bifuncional se vio comprobada genéticamente con la generación de una cepa de *S. coelicolor* M145 mutada en el gen *Sco2050*. Como era de esperarse, la mutante generada, denominada WH101, dio como resultado una auxótrofia para ambos requerimientos nutricionales, es decir, histidina y triptofano (Tabla 2-1). Este resultado sugiere que una sola isomerasa con especificidad de sustrato relajada lleva a cabo tanto la actividad de HisA como la de TrpF⁴⁷.

Tabla 2-1 Requerimientos nutricionales de la cepa *S. coelicolor* WH101 transformada con plásmidos que contienen los genes *priA*, *hisA* y *trpF*.

Cepa	Genotipo	Requerimientos Nutricionales
WH101	<i>priA::scar</i>	Histidina y triptofano
WH101 (pIJ702)	<i>priA::scar</i>	Histidina y triptofano
WH101 (pIJ702-PriASc)	<i>priA::scar</i> (PriA +)	Prototrofo
WH101 (pIJ702-TrpFEc)	<i>priA::scar</i> (TrpF +)	Histidina
WH101 (pIJ702-HisAEc)	<i>priA::scar</i> (HisA +)	Triptofano

Tabla adaptada de⁴⁷.

Por tal motivo, y con la finalidad de reflejar la actividad isomerasa del producto de *Sco2050* sobre distintos sustratos fosforribosilados, el gen fue renombrado *priA* (del inglés *phosphoribosyl isomerase A*), y la bifuncionalidad de PriA de *S. coelicolor*, así como de la de su ortólogo en *M. tuberculosis* (No. de gen *Rv1603*) fue confirmada a través de ensayos de complementación usando mutantes de *E. coli* afectadas en *hisA* y *trpF*⁴⁷. Con base en estos experimentos, se especuló en torno a la posibilidad de que PriA pudiera ser el ancestro común de HisA y TrpF. Sin embargo, la inexistencia de PriA fuera del clado de los actinomicetos¹⁴, y su similitud estructural con HisA y no así con TrpF sugieren una historia evolutiva diferente, posiblemente asociada a la pérdida del gen *trpF* en este grupo de bacterias.

2.1.2 Función enzimática de PriA

Las enzimas TrpF y HisA catalizan rearrreglos de Amadori, involucrando los sustratos PRA y ProFAR, respectivamente, convirtiéndolos a 1-[(2-carboxipentil)amino]-1deoxiribulosa 5-fosfato (CdRP, de sus siglas en inglés), en su actividad de TrpF, y a *N*-[(5'-fosforibulosi)formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (PRFAR, de sus siglas en inglés), en su actividad de HisA (Figura 2.1) ⁴⁷. La bifuncionalidad de PriA detectada *in vivo* consecuentemente implica estas funciones. Consistente con esto, la eficiencia catalítica de las actividades TrpF y HisA de PriA han sido determinadas *in vitro*, en $3 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ y $0.3 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, respectivamente ⁴⁹. El valor de la eficiencia catalítica de la actividad HisA de PriA es 10 veces menor a las enzimas HisA monofuncionales, por lo cual se supone una ganancia de la actividad TrpF, a expensas de la actividad HisA. Con estos datos reportados, y la gran similitud estructural entre HisA y PriA (*Root mean standard deviation* (RMSD) = 1.874 Å al alinear HisA de *T. maritima* y PriA de *S. coelicolor*), pareciera que PriA evolucionó desde un homólogo HisA hacia adquirir la actividad TrpF, conducida por presiones evolutivas asociadas a la pérdida anterior del gen *trpF* en el ancestro de los actinomicetos. La forma en que este proceso se llevó a cabo es el tema central de esta tesis.

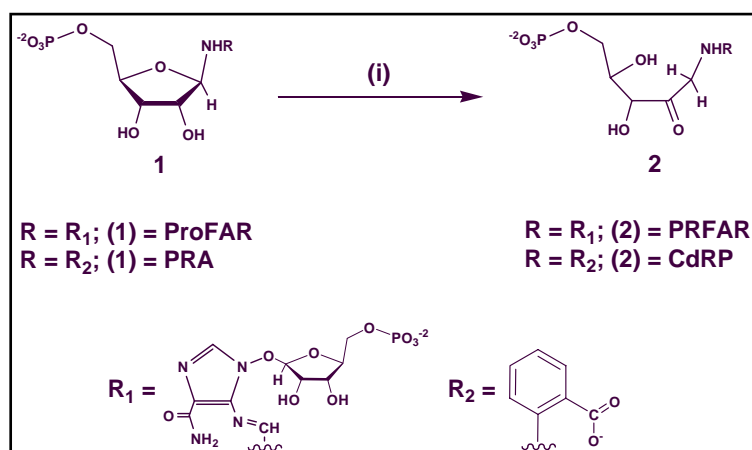


Figura 2.1. Conversiones enzimáticas llevadas a cabo por PriA y las enzimas monofuncionales HisA y TrpF, sobre los sustratos análogos ProFAR y PRA, que poseen dos y un grupo fosforribosil, respectivamente. (i) PriA ($\text{R} = \text{R}_1$ or R_2), HisA ($\text{R} = \text{R}_1$), or TrpF ($\text{R} = \text{R}_2$) Figura adaptada de la Ref. ⁵⁰.

2.1.3 Estructura tridimensional de PriA

La estructura cristalográfica de PriA a una resolución de 1.8 Å fue recientemente publicada (pdb: 1vzw, ⁴⁹). Sin embargo, la falta de densidad electrónica en las asas $\beta \rightarrow \alpha$ 1, 5 y 6 en esta estructura llevaron a lo que creemos son conclusiones incorrectas acerca de la relación estructura – función de PriA. HisA tiene dos sitios de unión a fosfato (PBS), lo que le permite unir con afinidad el sustrato ProFAR, que contiene dos ribosas fosforiladas (Figura 2.1). La unión de dicho sustrato ocurre con estereoquímica; la ribosa que será atacada durante la conversión enzimática forma un enlace amino con el grupo imidazolamino de dicho sustrato, y se une diferencialmente en el PBS C-terminal de la enzima. De esta forma, la segunda ribosa nunca es atacada, y se une en el PBS N-terminal ²². En contraparte, PRA, el sustrato de TrpF, tiene solo una molécula de ribosa fosforilada. Con base en observaciones estructurales, Wilmanns y colaboradores proponen que TrpF puede ser unido inespecíficamente en cualquiera de los dos PBS de PriA y por tal motivo, usar grupos diferentes de residuos catalíticos ⁴⁹ (Figura 2.2). Lo anterior surge de la hipótesis de que los barriles $(\beta\alpha)_8$ provienen de la duplicación de dos barriles $(\beta\alpha)_4$ ^{51; 52}, y por tal motivo existe simetría en las mitades del barril. A pesar de que lo anterior podría ser posible, asumir que debido a esto PriA posee, en la misma cavidad, dos triadas catalíticas, y que residuos tales como la valina en posición 52 pudieran actuar como ácido o base, resulta completamente inconsistente con nociones básicas de regio-especificidad.

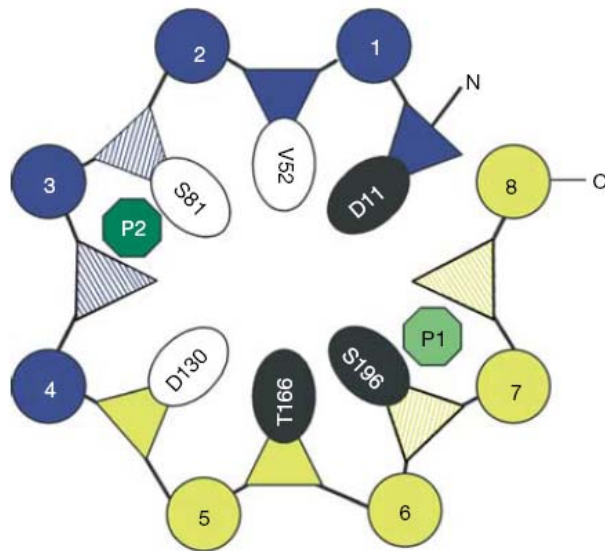


Figura 2.2. Representación esquemática del sitio activo de PriA. Alfa hélices se indican como círculos y hojas beta como triángulos. Los sitios de unión a fosfato carboxi y amino, respectivamente, se indican como P1 y P2. Residuos en negro corresponden a la triada catalítica cuando PRA es unido en P1 y residuos en blanco funcionan como la triada catalítica en el caso en el cual PRA es unido a P2 ⁴⁹.

2.2 Evolución y dinámica de los genes *trp* en actinomicetos

En el año 2004, Jensen y colaboradores elaboraron un árbol filogenético usando como marcador molecular, de forma concatenada, a todos los genes involucrados en la biosíntesis del triptofano. Este análisis incluyó secuencias de 47 microorganismos de diferentes familias, entre ellos los actinomicetos *B. longum*, *C. diphtheriae*, *C. glutamicum*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, *S. avermitilis*, *S. coelicolor* y *Thermobifida fusca*. El resultado obtenido fue la división de todos los organismo en 7 familias diferentes (Figura 2.3), y la presencia de las dos corinebacterias (*C. glutamicum* y *C. diphtheriae*) en el grupo de las enterobacterias y no junto al resto de los actinomicetos ⁵³. La ausencia del gen *trpF* en el genoma, y por ende la presumible presencia de una enzima bifuncional PriA, es notable en todos los actinomicetos (Tabla 2.2 y Figura 2.4) ¹⁴. La excepción a esta regla general la representan ciertas especies del género *Corynebacterium* (i.e. *C. glutamicum*, *C. diphtheriae* y *C. efficiens*), que como hemos mencionado anteriormente, han adquirido mediante un proceso de transferencia

horizontal, un operon *trp* característico de las proteobacterias, el cual incluye una fusión *trpC-trpF*⁵³.

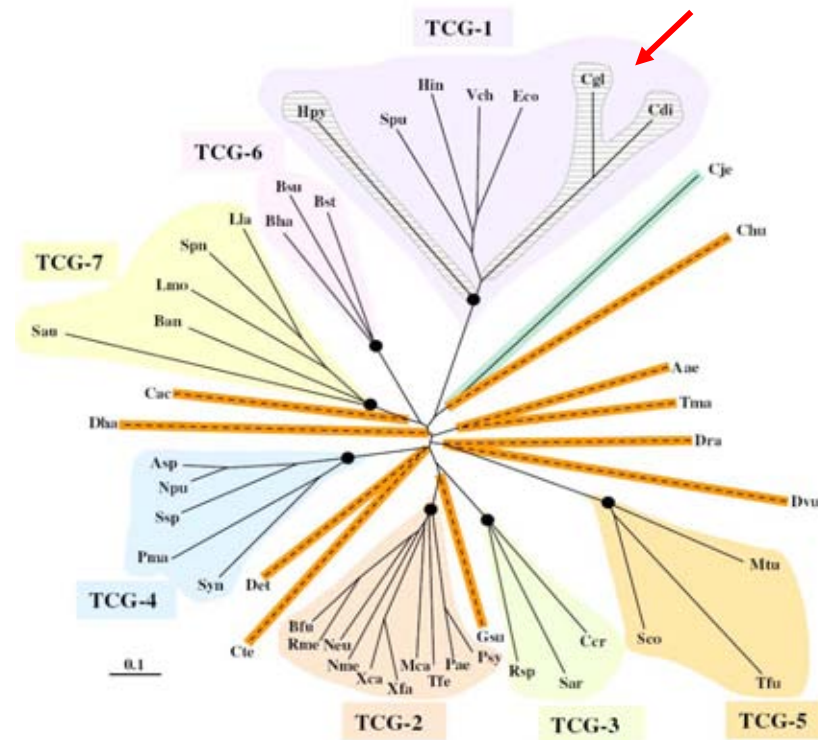


Figura 2.3. Filograma construido a partir de genes *trp* concatenados. Los diferentes colores indican familias diferentes de bacterias. La flecha roja indica dos corinebacterias agrupadas incongruentemente junto a las proteobacterias (familia TCG-1), en lugar de junto al resto de los actinomicetos (familia TCG-5). Las familias utilizadas y los nombres completos de los microorganismos puede ser consultado en la referencia original ⁵³.

Por esta razón, las actividades enzimáticas de los homólogos de PriA en estas corinebacterias han sido exploradas por otros miembros del laboratorio (Geovani López Órtiz, tesis de licenciatura, UAM-Iztapalapa), y se demostró que éstas han perdido su actividad TrpF y no así su actividad HisA (Tabla 2.1). En estas bacterias se ha notado que el cluster conservado que contiene la mayoría de los genes *his* y *trp* se ha visto deteriorado (Figura 2.4), aunque conserva evidencias de que existió, debido a que algunos genes (como *trpC* y *lgt*) se encuentran en el mismo contexto genómico que en el resto de los actinomicetos.

Las enzimas HisA de estas corinebacterias fueron denominadas “neo-HisA”, debido a que han sufrido un proceso evolutivo, que, partiendo de una enzima que alguna vez fue PriA, regresaron a ser solamente HisA. Recientemente se han publicado dos genomas nuevos de corinebacterias, i.e. *C. jeikeium* y *C. urealyticum*, las cuales carecen de un gen *trpF* y cuentan con un cluster *his/trp* conservado (Figura 2.4). El gen *priA* de *C. jeikeium* fue sintetizado por miembros del laboratorio (Sofía Medina-Ruiz, tesis de licenciatura, UNAM y Paul Gaytan, Síntesis y Secuenciación, IBt-UNAM), y su bifuncionalidad comprobada experimentalmente (Tabla 2-2).

Tabla 2-2 Actividades de homólogos selectos de PriA

	Actividad HisA ^a	Actividad TrpF ^b
HisA (<i>E. coli</i>)	+	-
PriA (<i>S. coelicolor</i>)	+	+
PriA (<i>S. scabies</i>)	+	+
PriA (<i>M. tuberculosis</i>)	+	+
PriA (<i>C. jeikeium</i>)	+	+
Neo-HisA (<i>C. glutamicum</i>)	+	-
Neo-HisA (<i>S. diphtheriae</i>)	+	-

Actividad medida a través de habilidad de complementar la función (a) HisA en la cepa HFrG6⁵⁴ y (b) TrpF en la cepa FBG-Wf⁵⁰.

Hasta la fecha nuestro grupo ha identificado diferentes homólogos de PriA y neo-HisA. Sin embargo, el mecanismo de acción de estas enzimas no ha sido esclarecido y los residuos involucrados en mediar la bifuncionalidad de PriA son desconocidos. Por tal motivo, y debido a la existencia de dos enzimas cercanas en secuencia (~70% ID entre PriA_Sc y neo-HisA) resulta llamativo adoptar un acercamiento evolutivo, compaginado a un acercamiento estructural clásico, para elucidar el mecanismo de reacción de PriA, pero sobre todo la ruta de adquisición de mutaciones que permitan cambiar entre las diferentes actividades.

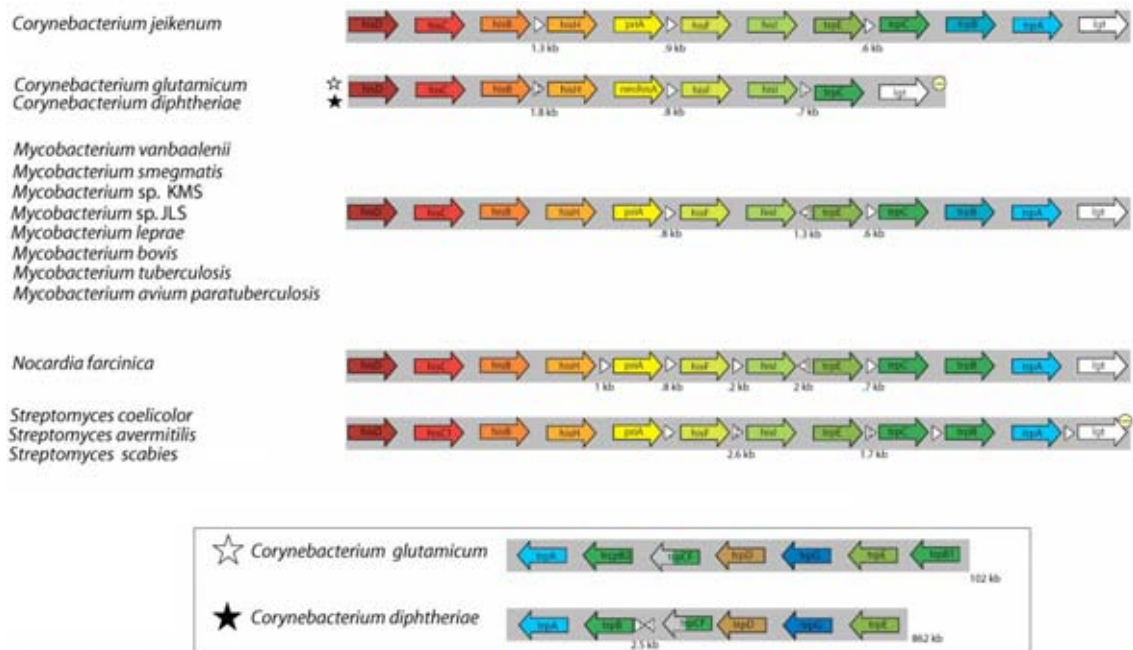


Figura 2.4. Organización del cluster de genes *his/trp* que se encuentra conservado en actinomicetos (se muestran sólo ejemplos selectos). En la gama de color rojo se muestran los genes involucrados en la biosíntesis de la histidina y en la gama de colores azul-verde se muestran los genes involucrados en la biosíntesis del triptofano. En el recuadro inferior se muestran los operones *trp* entéricos presentes en las corinebacterias. Figura adaptada de ¹⁴ con la generosa ayuda de S. Medina-Ruiz.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Identificar los residuos catalíticos, en particular los de sitio de unión a sustrato, de la enzima bifuncional PriA, siguiendo un acercamiento evolutivo.

3.2. Objetivos Específicos

1. Identificar aquellos residuos que podrían tener un papel funcional y evolutivo, en la aparición de la bifuncionalidad de PriA, mediante alineamientos de secuencias de PriA y HisA, incluidas las variantes monofuncionales neo-HisA.
2. Recrear en PriA de *S. coelicolor* las mutaciones o variabilidad natural, identificados en el objetivo específico 1, mediante mutagénesis dirigida.
3. Analizar el efecto de las mutaciones generadas sobre la bifuncionalidad de PriA, mediante ensayos de complementación en mutantes de *E. coli*.
4. Evaluar el efecto combinado de las mutaciones seleccionadas, según su contribución funcional, haciendo uso de mutación combinatoria.
5. Obtener las estructuras tridimensionales de mutantes selectas de PriA, mediante cristalografía de rayos X.

4. Hipótesis

La búsqueda de residuos funcionales en PriA mediante su comparación a nivel de secuencia y estructura, con homólogos monofuncionales, provenientes tanto de la familia de los actinomicetos como de otros linajes bacterianos, permitirá: (i) definir y acotar topológicamente el sitio activo de PriA; (ii) identificar residuos que contribuyen a la especificidad de sustrato dual de PriA; y (iii) evaluar, en retrospectiva, el proceso evolutivo mediante el cual la enzima PriA adquirió su actividad TrpF, sin sacrificar su actividad HisA.

5. Justificación

Uno de los objetivos primordiales de los investigadores enfocados al área de las proteínas es entender la relación que existe entre la estructura, secuencia y función de las mismas, en particular, de las enzimas. Debido a que el 10% de las proteínas adoptan el plegamiento $(\beta\alpha)_8$, y a que éste es catalíticamente el plegamiento más versátil, éstas han sido consideradas como modelos de experimentación ³⁶. Debido a que la proteína estudiada en esta tesis adopta este plegamiento, el conocimiento generado podría servir para establecer reglas generales sobre los procesos evolutivos asociados a la versatilidad catalítica intrínseca de los barriles $(\beta\alpha)_8$; esta información podría ser útil para el desarrollo de estrategias experimentales de evolución dirigida, así como para el diseño de nuevos fármacos que inhiban a esta enzima en actinomicetos patógenos, tales como *M. tuberculosis* ⁵⁵.

Desafortunadamente, el acercamiento de evolución dirigida, aunque relativamente exitoso en cuanto a su aplicación, carece de un marco racional (es fundamentalmente aleatorio), y más aún, falla en reproducir las rutas evolutivas que tienen lugar en la naturaleza. El acercamiento central de este proyecto tiene la ventaja de sobrepasar estas limitaciones en cuanto que cuenta con un modelo de evolución natural, dentro de un contexto estructural y genómico, a partir del cual se pueden plantear estrategias semi-rationales de evolución dirigida, basadas en el entendimiento de la relación estructura-función de este barril $(\beta\alpha)_8$. En consecuencia, se anticipa que el diseño racional y síntesis de moléculas inhibitorias, es altamente factible. En resumen, anticipamos que este proyecto sentará las bases para dos futuros desarrollos: (i) el planteamiento de nuevas y mejores estrategias para la evolución dirigida de barriles $(\beta\alpha)_8$, y (ii) el desarrollo de posibles moléculas inhibitorias de las actividades de PriA, con aplicación en patógenos de interés humano.

6. Materiales y Métodos

6.1. Construcción de filogenias

Todos los análisis filogenéticos fueron realizados utilizando los mismos parámetros en los alineamientos y construcción de filogenias. Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas utilizando Muscle ⁵⁶ (Anexo 3) con los parámetros establecidos por este programa. Para conocer el modelo evolutivo adecuado para llevar a cabo la reconstrucción filogenética se utilizó el programa ProTTest ⁵⁷. El mismo permite identificar, entre 97 modelos de sustitución diferentes el adecuado para las secuencias de aminoácidos de PriA seleccionadas. A partir de estos resultados (ver anexo 5) se eligió el modelo WAG+G+F (modelo matriz de sustitución WAG, estimando la proporción de sitios invariables (G) y tomando en cuenta la frecuencia de aminoácidos (F)). La filogenia fue realizada con PhyML ⁵⁸. Utilizando el mismo modelo evolutivo y el programa PhyML se realizó un análisis de “bootstrap”, a partir de 1000 réplicas del alineamiento para soportar estadísticamente la posición de cada rama.

Las secuencias de nucleótidos fueron alineadas por codones utilizando el programa Pal2Nal ⁵⁹. Las filogenias construidas a partir de este alineamiento fueron realizadas con el programa PhyML, utilizando el modelo HKY y estimando la relación entre transiciones/transversiones ⁶⁰, así como la proporción de sitios invariables. La estimación de la relación (ω) entre cambios sinónimos y no sinónimos (DN/DS, por sus siglas en inglés) y la sitios bajo selección positiva en las secuencias de DNA se llevó a cabo con el programa Codeml de PAML 3.15 ⁶¹, utilizando el análisis “Bayes Empirical Bayes (BEB)” ⁶². Para estimar la probabilidad de encontrar un codón bajo selección positiva ($\omega > 1$). Se utilizó el modelo cero (Model = 0), el cual nos permite buscar entre los diferentes codones y los modelos de selección 2 y 8 (selección positiva).

6.2. Simulaciones de acoplamiento proteína – ligando “docking” de PriA

A pesar de los enormes esfuerzos realizados no se ha logrado obtener cristales de PriA con análogos de los sustratos; por tal motivo, y con el objetivo de facilitar el entendimiento de la estructura – función de PriA, se han llevado a cabo simulaciones de interacciones proteína – ligando “docking”, mismas que fueron hechas con el software Molegro Virtual Docker ⁶³. Las coordenadas 3D de PRA fueron obtenidas con PRODRG ⁶⁴ y las coordenadas de la forma reducida de PRFAR se obtuvieron del PDB 1jvn ⁶⁵.

6.3. Generación de mutaciones puntuales

Las diferentes mutaciones puntuales en el gen *priA* fueron realizadas utilizando el método de megaprimers ⁶⁶. En la tabla 1 se muestran los oligonucleótidos diseñados para la generación de cada mutación puntual. Se amplificaron los extremos 5' y 3' independientemente, utilizando como templado el gen *priA* clonado en el vector comercial pGEX-4T-1 ⁴⁷ en los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Una vez generados los dos extremos del gen con los oligos mutagénicos, se realizó una tercera reacción de PCR, utilizando los productos previamente amplificados como megaprimers y añadiendo los oligos de los extremos pGEX_seq_for/rev (Tabla 6.1) que hibridan al vector comercial. Con estos oligos se amplificó un producto que incluía *priA* y los sitios de restricción, de manera que el producto final posee los sitios previamente mencionados. Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo utilizando la enzima *Pfu*, producida y purificada en el laboratorio; las condiciones de amplificación se muestran en el anexo 2. Una vez amplificados, los productos de PCR se purificaron de un gel de agarosa, para lo cual se utilizó el kit *High pure PCR product purification* (Roche) y posteriormente se realizó una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*

(*NewEngland Biolabs*), preparando la mezcla de reacción siguiendo las recomendaciones del proveedor, e incubando durante toda la noche a 37°C. Los productos digeridos fueron clonados en el vector pGEX-4T-1, digerido con las mismas enzimas, para esto se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (*Gibco*) y se siguieron las recomendaciones del proveedor. Los plásmidos generados se denominaron: pGEXPriAL4F, pGEXPriAD11A, pGEXPriAR19A, pGEXPriAV21D, pGEXPriAL51F, pGEXPriAG59N, pGEXPriAI67M, pGEXPriAS81T, pGEXPriAT110K, pGEXPriAG128D, pGEX_PriA_D130A, pGEXPriAD130Q, pGEXPriAL136T, pGEXPriAR139N, y pGEXPriAT166A, pGEXPriAD171A. La construcción pGEX_PriA_T29K se realizó anteriormente a este trabajo utilizando un kit de mutagénesis sitio-dirigida utilizando las condiciones estándar y las recomendaciones del proveedor (Stratagene) (Barona-Gómez, F).

La construcción de las dobles mutantes pGEX_PriA_A37S/I67M, pGEX_PriA_A37S/T110K y pGEX_PriA_I67M/T110K se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que las mutantes sencillas. Sobre la mutante pGEX_A37S se construyeron las mutantes pGEX_PriA_A37S/I67M, pGEX_PriA_A37S/T110K y sobre la mutante pGEX_PriA_I67M se construyó la doble mutante pGEX_PriA_I67M/T110K. La construcción de todas las dobles mutantes fue verificada por secuenciación.

Tabla 6-1 Oligonucleótidos diseñados para la inserción de mutaciones puntuales en el gen *priA* de *S. coelicolor*.

Nombre	Secuencia 5'- 3'	Función
L4F_for	gag caa gtt tga act cct ccc cgc cgt cg	Oligos mutagénicos, donde el oligo "for" se utiliza para amplificar el extremo 3' y el oligo "rev" para amplificar el extremo 5' del gen <i>priA</i>
L4F_rev	cga cgg cgg gga gga gtt caa act tgc tc	
V21D_for	ccg cct cga tca cgg cga gtc cgg c	
V21D_rev	gcc gga ctc gcc gtg atc gag gcg g	
A37S_for	ccc cgc tgg agt ccg ccc tgc cct ggc	
A37S_rev	gcc agg cga ggg cgg act cca gcg ggg	
L51F_for	tgg ctg cac ttc gtg gac ctg	
L51F_rev	cag gtc cac gaa gtg cag cca	
G59N_for	gcg gcg ttc aac acc ggg gac	
G59N_rev	gtc ccc ggt gtt gaa cgc cgc	
I67M_for	cgg gac cgg gga caa ccg cgc gct gat ggc cga ggt cg	
I67M_rev	ggc ctg cgc gac ctc ggc cat cag cgc gcg gtt gtc c	
S81T_for	gga gct gac cgg cgg cat ccg cg	
S81T_rev	cgc gga tgc cgc cgg tca gct cc	
T110K_for	ggg cac ggc cgc cct gga gaa acc cg	
T110K_rev	cgg gtt tct cca ggg cgg ccg tgc cc	
G128D_for	cgc ggt cga tct gga cgt acg ggg c	
G128D_rev	gcc ccg tac gtc cag atc gac cgc g	
D130A_for	cgc ggt cgg cct ggc ggt acg ggg c	
D130A_rev	gcc ccg tac cgc cag gcc gac cgc g	
L136T_for	acg ggg cac cac gac ccg cgg ccg cgg ctg g	
L136T_rev	cca gcc gcg gcc gcg ggt cgt ggt gcc ccg t	
R139N_for	ccg cgg caa tgg ctg gac ccg cga cgg cgg cg	
R139N_rev	cgc cgc cgt cgc ggg tcc agc cat tgc cgc gg	
L211Y_for	cgc cgg gta tgt ccc ggc cgg tgt cg	
L211Y_rev	gca cac cgg ccg gga cat acc cgg cg	
pGEXseq_for	ggg ctg gca agc cac gtt tgg tg	Oligos de los extremos 5' y 3' para amplificar <i>priA</i>
pGEXseq_rev	ccg gga gct gca tgt gtc aga gg	

6.4. CoFi (*Colony Filtration*) Blot

Anteriormente al presente trabajo se intentó, sin ningún éxito, expresar y purificar la fusión GST-PriA. Debido a la necesidad de verificar que la enzima PriA y las mutantes construidas se expresan apropiadamente y que por ende, la función catalítica medida *in vivo* no está asociada a la expresión enzimática, se siguió una metodología que permite verificar la expresión de proteínas solubles dentro de la bacteria. Este nuevo método, CoFi Blot ⁶⁷, permitió evaluar lo previamente planteado.

Para evitar falsos positivos se utilizó la cepa *E. coli* (ECK1631) *gst-* de la colección KEIO ⁶⁸ que fue transformada con los plásmidos que contienen la fusión GST-PriA silvestre y las diferentes mutantes. Colonias sencillas fueron sembradas en agar LB/Amp durante 10 horas a 37°C. Las mismas fueron levantadas con una membrana Durapore 0.45 µm (Millipore) y el filtro fue colocado, con las colonias hacia arriba, en una nueva caja de LB/Amp con 1 mM de isopropil tiogalactosido (IPTG). La inducción se llevó a cabo durante 15 horas a 22°C, después de lo cual el filtro con las colonias fue colocado en una membrana de nitrocelulosa y 3MM papel Whatman, sumergidos en buffer de lisis (20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml Lisosima, 0.75mg/ml DNase I, 1 tableta de mini Complete sin EDTA/10 ml (Roche)). El “*sándwich*” fue incubado durante 30 min a 22°C y después de lo cual fueron llevados a cabo para favorecer la lisis, tres ciclos consecutivos de congelación – descongelación (10 min a -70°C y 10 min 37°C). Una vez terminados, la membrana de nitrocelulosa fue retirada e incubada con 1% de BSA en buffer TBST (20 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20). La membrana fue lavada con TBST durante 10 min con agitación, tres veces consecutivas, después de lo cual fue incubada durante una hora y con agitación constante con el anticuerpo primario contra GST (GST (B-14) 1:10,000 diluido con TBST, *Santa Cruz Biotechnology*). Se lavó la membrana tres veces durante 10 min cada vez y se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario de cabra contra IgG de ratón y asociado a peroxidasa

diluido 1:10,000 con TBST (*Santa Cruz Biotechnology*), después de lo cual la membrana fue lavada nuevamente 3 veces por 10 min con TBST.

Para revelar las membranas se llevó a cabo la técnica de quimioluminiscencia, utilizando el Kit ECL, Amersham Pharmacia Biotech, mezclando 1:1 el agente revelador 1 y el agente revelador 2. Estas soluciones contienen el sustrato para la enzima peroxidasa del anticuerpo dando como resultado una reacción luminosa, la membrana se expuso durante un tiempo adecuado (1-5 s) en una placa fotográfica (X-Omat, Kodak).

6.5. Ensayos de complementación

Para analizar *in vivo* la actividad de las mutantes de PriA generadas se realizaron ensayos de complementación. Se transformaron las cepas HisA⁻ (*E coli*, Hfr G6) y TrpF⁻ (*E coli* JM101, FBG_Wf) con los plásmidos pGEX_PriA_L4F, pGEX_PriA_V21D, pGEX_PriA_T29K, pGEX_PriA_L51F, pGEX_PriA_G59N, pGEX_PriA_I67M, pGEX_PriA_S81T, pGEX_PriA_T110K, pGEX_PriA_G128D, pGEX_PriA_D130A, pGEX_PriA_L136T, pGEX_PriA_R139N y pGEX_PriA_L211Y. Como control negativo se utilizó el vector vacío (pGEX-4T-1) y como control positivo la enzima PriA silvestre de *S. coelicolor*, que se encuentra en el vector pGEX_PriA_Sc⁴⁷. Se inoculó una colonia con el plásmido de interés en 2 ml de medio LB/Amp y se incubó a 37°C por 4 horas a 300 rpm. Una vez transcurrido el tiempo se concentró el contenido celular correspondiente a 1.5 ml centrifugando 5 min a 3000 rpm. Las células fueron lavadas tres veces con PBS y una vez lavadas, se determinó la densidad óptica (OD) de las suspensiones celulares a 600 nm de longitud de onda (Spectronyc 20 Genesys, *Spectronic Instruments*). Las suspensiones celulares se ajustaron a una OD de 0.1 con PBS, lo que corresponde a 1 x 10⁸ células por ml. Se realizaron las diluciones pertinentes de manera que se obtuvo una concentración de 1 x 10⁴ células por mililitro, de las cuales fueron

sembradas 200 células en cajas petri con medio mínimo M9 (ver anexo 1) y se incubó el tiempo suficiente para comprobar la habilidad de complementar. Como control del crecimiento se sembró la misma cantidad de células en LB/Amp, lo que nos permitió contar el número total de unidades formadoras de colonia (UFC).

6.6. Caracterización funcional y estructural de PriA y mutantes

6.6.1. Determinación de parámetros cinéticos de la actividad TrpF en PriA y mutantes

Para determinar los parámetros cinéticos, se clonaron las mutantes puntuales previamente realizadas en el vector pET-15b (Novagen), para lo cual se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos, los sitios de restricción se encuentran subrayados, 5'-CCCGGGATCCGGGCGAAACCGAAGGACTC-3' (sitio *Bam*HI) y 5'-GGAATTCATATGAGCAAGCTCGAACTC-3' (sitio *Nde*I). Estos oligonucleótidos fueron utilizados para amplificar el gen *priA* (condiciones de PCR en el Anexo 2) a partir de las construcciones en el vector pGEX. Los productos de PCR, al igual que el vector pET-15b fueron digeridos con las enzimas *Nde*I (NE Biolabs) y *Bam*HI (NE Biolabs) y ligados con la enzima T4-DNA ligasa (NE Biolabs) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los resultados de las clonaciones fueron verificadas, primero por electroforesis en gel de agarosa, mediante la liberación del inserto originalmente clonado, y posteriormente mediante secuenciación.

Las construcciones resultantes, denominadas pET_PriA_L4F, pET_PriA_V21D, pET_PriA_T29K, pET_PriA_L51F, pET_PriA_G59N, pET_PriA_I67M, pET_PriA_S81T, pET_PriA_T110K, pET_PriA_G128D, pET_PriA_D130A, pET_PriA_L136T, pET_PriA_R139N, pET_PriA_L211Y, contienen el gen de *priA* clonado con una cola de histidinas, lo que facilitará

su purificación y cristalización bajo las condiciones previamente reportadas⁶⁹.

Para realizar la cinética enzimática se sintetizó *in situ* el sustrato PRA^{70: 71}. La actividad de PRA isomerasa se midió detectando la producción de CDRP a 350 nm (Cary100, Varian) inmediatamente después de agregada la enzima (80 µg/ml de cada la enzima silvestre y las mutantes, purificadas por afinidad (ver 6.7.2) a la mezcla de reacción (80 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.4 mM EDTA, 0.1 mM ácido antranílico y 0.1 mM ribosa-5-fosfato). La reacción fue monitoreada durante 20 min⁶⁹.

La expresión, inducción, purificación y cristalización de las mutantes de PriA se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente estandarizado para la enzima silvestre⁶⁹.

6.6.2. Expresión e inducción

Para llevar a cabo la expresión de PriA y mutantes se utilizó la cepa *E. coli* C41⁷² transformada con el plásmido pRIL4 (Stratagene) y con los vectores construidos en el sistema pET (ver 6.5). A partir de una colonia sencilla se preparó 1 ml de cultivo inoculo (LB/Amp y 34 mg/ml de Chlo) que se incubó durante 16 horas a 37°C para después inocular 1L de medio LB/Amp/Chlo, mismo que es incubado a 37 °C con agitación constante (180 rpm) hasta obtener una densidad de óptica de 0.6 – 0.8, medida a 600 nm de longitud de onda (Cary 100, Varian). Después de lo anterior se indujo la expresión con IPTG 1mM y el cultivo fue incubado durante 20 horas a 20°C con agitación constante (180 rpm).

Las células fueron recolectadas por centrifugación (6000 rpm, 20 min) y almacenadas a -20°C hasta su futura utilización.

6.6.3. Purificación

Para realizar la purificación de PriA silvestre y mutantes se utilizaron dos métodos consecutivos, el primero de ellos cromatografía de afinidad a Níquel, haciendo uso de la cola de histidinas que posee la proteína quimérica, y el segundo cromatografía de exclusión molecular.

Las células recolectadas fueron lisadas por sonicación (Sonifier450, Branson) en *buffer* lisis (50mM Tris pH 8.0, 0.5mM EDTA pH 7.7, 50mM NaCl, 5% Glicerol, 0.1mM DTT y 100 µg/ml lisozima) durante 20 s 6 veces, con intervalos de 20 s en hielo. Para obtener la fracción soluble que contiene las proteínas de interés, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm durante 15 minutos, la fracción soluble fue mezclada con 5 ml de sefarosa (Qiagen) previamente activada con Níquel. La mezcla se incubó durante 5 min a 4°C en agitación constante y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min, proceso donde se decanta la fase líquida. Para purificar la proteína y separarla de aquellas con baja afinidad a níquel se realizaron tres lavados con buffer con bajo contenido de imidazol. El primer lavado se llevó a cabo con 10 ml de *buffer* de lavado A (50mM Hepes pH 8, 1M NaCl y 10mM Imidazol). La mezcla se incubó por 5 min a 4°C en agitación constante, después de lo cual se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min. Se realizaron dos lavados posteriores con 10 ml de *buffer* de lavado B (50mM pH 8.0 1M NaCl y 20 mM Imidazol), siguiendo el procedimiento antes explicado. Para obtener la muestra final, se eluyó con 20 ml de *buffer* de elusión (50mM Hepes pH 8, 100 mM NaCl y 100 mM Imidazol), incubando durante 30 min a 4°C con agitación constante. Se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante fue recuperado y concentrado mediante ultra centrifugación (Amicon Ultra, Millipore) hasta un volumen final de 2 ml. Para determinar la pureza de la muestra obtenida se llevó a cabo SDS – PAGE.

Debido a que la pureza obtenida mediante cromatografía de afinidad no es suficiente para obtener cristales, se llevó a cabo una segunda etapa de

purificación por cromatografía de exclusión molecular. Los 2 ml de enzima anteriormente obtenidos fueron aplicados en una columna Superdex 75 (GE LifeSciences) previamente equilibrada (50mM Tris pH 8.0, 200mM NaCl, 0.5 mM DTT 1 mM EDTA). Se corrió la muestra a un flujo constante de 2.0 ml min⁻¹ a 4°C (AktaPrime, Amersham Biosciences). Las fracciones que contienen PriA fueron recolectadas y concentradas mediante ultra centrifugación (Amicon Ultra, Millipore) hasta una concentración final de 12 mg/ml. La concentración de proteínas fue medida a 590 nm de longitud de onda (Bio-Rad, Protein Assay) y siguiendo las recomendaciones del proveedor.

6.6.4. Cristalización

Para la obtención de cristales se utilizaron colecciones de soluciones de “Molecular Dimension Ltd” (MDL) y “Emerald Biostructures Inc” basadas en el método de matrices incompletas, utilizando el método de la gota colgante y las condiciones previamente descritas para PriA silvestre ⁶⁹. Todos los cristales fueron crio-preservados agregando a la mezcla del licor madre 30% de etilenglicol y difractados utilizando un equipo de ánodo rotatorio para asegurar su integridad (ver anexo 7).

6.6.5. Reemplazo molecular y afinamiento

Los parámetros de la celda unitaria de la mutante R139N fueron determinados utilizando el programa Mosflm ⁷³ y las intensidades fueron posteriormente escaladas y truncadas, con el programa SCALA ⁷⁴. Al igual que la enzima silvestre (pdb 1vzw y 2vep), el grupo espacial fue P 3₁21.

Para resolver las fases se utilizó la metodología de reemplazo molecular, utilizando como modelo a la enzima silvestre (pdb 2vep) y el

programa Phaser en la plataforma de CCP4 ⁷⁵. La estructura fue refinada utilizando ciclos de Refmac 5 ⁷⁶.

7. Resultados y Discusión

7.1. Establecimiento de la relación estructura/función de PriA¹.

Al momento de iniciarse el presente proyecto, nuestro grupo contaba con dos estructuras cristalográficas propias de PriA. Una de ellas contiene las mutaciones A37V y I67M, lo cual fue aprovechado para resolver la fase de la estructura silvestre a través de experimentos de sustitución con selenometionina en la posición 67 por nuestros colaboradores británicos (Prof. Vilmos Fülöp y Dra. Helena Wright). A pesar de que ambas estructuras (silvestre y mutante) fueron obtenidas bajo las mismas condiciones de cristalización y refinadas siguiendo los mismos parámetros, por lo que se pueden considerar virtualmente idénticas en términos cristalográficos, la estructura silvestre contiene densidad para todas las asas, mientras que la mutante tiene desordenadas las asas 1 y 6. Esta observación inicial fue interpretada como evidencia circunstancial sobre la existencia de diferentes conformeros de PriA (Figura 7.1). Independientemente de esta posibilidad, el modelo para la proteína silvestre representa la primer estructura con densidad a todo lo largo del polipéptido de PriA, lo que permitió observar nuevas interacciones entre residuos, y racionalizar experimentos de mutagénesis dirigida. Estos experimentos, como se discute en las siguientes secciones, explicaron dos aspectos fundamentales de la relación estructura/función de PriA: (i) el posible mecanismo de reacción de PriA, incluyendo la definición de su sitio activo; y (ii) identificar los determinantes estructurales que median la especificidad por los diferentes sustratos a través de cambios conformacionales.

¹ Los resultados de esta sección han sido publicados previamente (Ref. No. 50)

7.1.1. Sitio activo de PriA

La estructura de PriA silvestre (confórmero cerrado) no solo es relevante en el contexto de esta sub-familia de enzimas, sino que representa la primer estructura completa de un homólogo de HisA. Por tal motivo, las interacciones observadas resultan relevantes en el entendimiento de la relación estructura/función de ambas familias de proteínas.

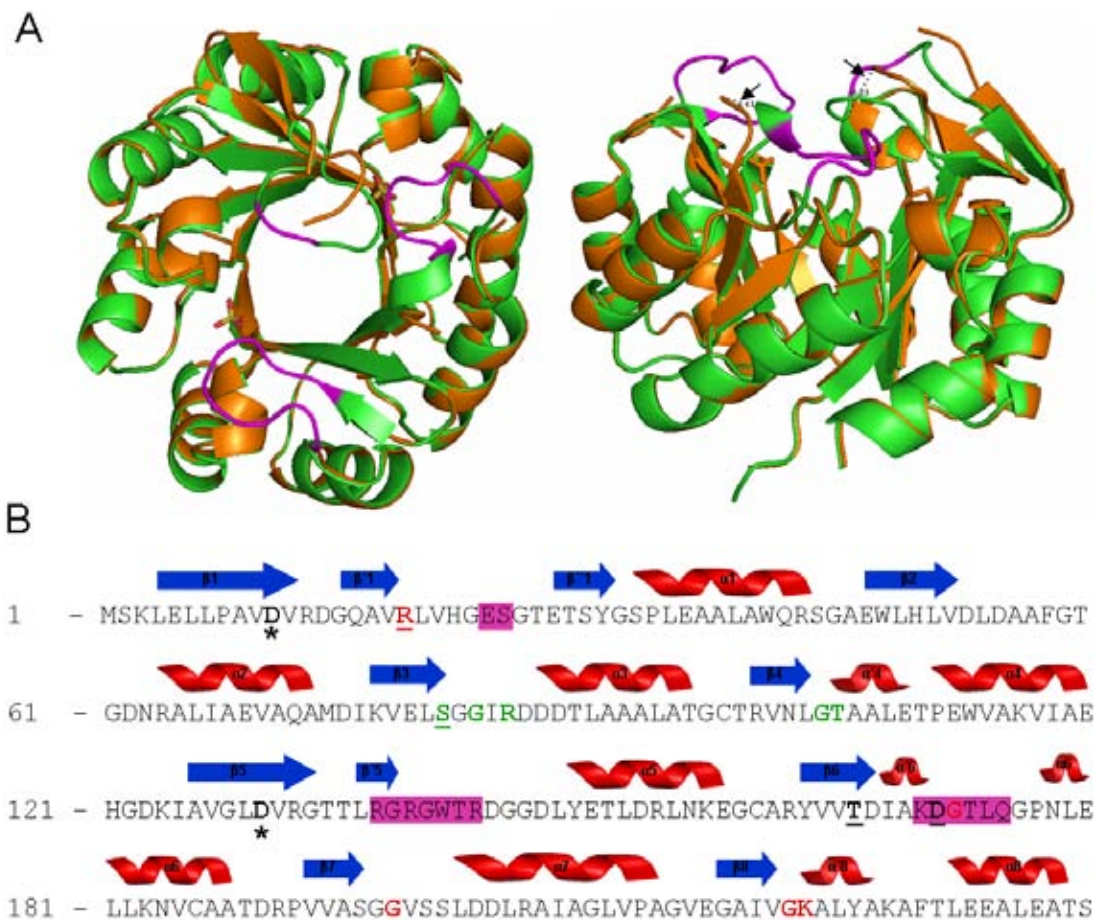


Figura 7.1 Comparación estructural entre los confórmeros de PriA. **A.** Alineamiento estructural entre los confórmeros abierto (SeMet) y cerrado (silvestre). Las asas funcionales 1 y 6 del confórmero cerrado se muestran en magenta. En puntos negros se indica la distancia que existe entre las asas 1 y 6 de los dos confórmeros (4.83 Å y 4.11 Å, respectivamente). **B.** Se muestran la estructura secundaria y residuos funcionalmente importantes; D11 y D130 (catalíticos) están marcados con asteriscos; T166 y D171 (“conformacionales”) están subrayados; residuos del PBS N-terminal en verde y PBS C-terminal en rojo, incluyendo R19 y S81, que también están subrayados. Las zonas que faltan en el confórmero abierto están marcadas en magenta. Leer texto para más detalles.

En el confórmero cerrado, las asas funcionales 1 y 6 interactúan a través de un puente de hidrógenos formado por la cadena principal de los residuos H22 y D171. Es importante hacer notar que dichas asas, junto con el asa 5, además de ser flexibles, dan origen a las hojas beta donde están localizados los residuos con un papel funcional identificado para HisA (D11-β1, D130-β5 y T166-β6) ²³. El papel funcional de dichos aminoácidos en PriA fue comprobado a través de mutagénesis sitio dirigido y ensayos de complementación en mutantes de *E. coli*. Los resultados de estos experimentos se incluyen en la Tabla 7-1.

Tabla 7-1 Análisis funcional de mutantes del sitio activo de PriA

Mutante	Actividad	Tiempo (hrs) ^b	Actividad	Tiempo (hrs) ^b
	TrpF ^a		HisA ^a	
Silvestre	1	31	1	40
D11A (catalítico)	0	nc	0	nc
R19A (C-PBS)	>1	31	0	nc
S81T (N-PBS)	0	nc	0.93	71
D130A (catalítico)	0.01	nc	0	nc
D130Q (catalítico)	0	nc	0	nc
T166A (conformacional)	0	nc	0	nc
D171A (conformacional)	0.14	74	0	nc
Control negativo	0	nc	0	nc

(a) El valor corresponde a la relación de UFC entre LB y medio mínimo y normalizado con el valor de la enzima silvestre. (b) Tiempo ocurrido para la aparición de las colonias (tamaño = 0.1 mm); nc: no complementó.

Como era de esperarse, la mutación en los residuos D11 y D130 eliminó las dos actividades de PriA. Sin embargo, puede notarse que la mutante D130A conserva niveles residuales de la actividad TrpF. El ADN plasmídico de las colonias que aparecieron ocasionalmente fue purificado y secuenciado para verificar que la mutación siguiera presente. El hecho de que la mutante D130A mantuvo cierta actividad TrpF resulta congruente con experimentos previos en HisA, en los cuales se ha demostrado que para obtener la actividad TrpF el residuo 130 tiene que ser mutado a valina,

leucina, lisina, treonina, prolina, alanina, glicina, o fenilalanina^{23; 48}. Por tal motivo, fue construida la mutante D130Q. Posiblemente debido a la carga positiva presente en el nuevo residuo, este cambio provoca que PriA pierda las dos actividades por completo (Tabla 7-1).

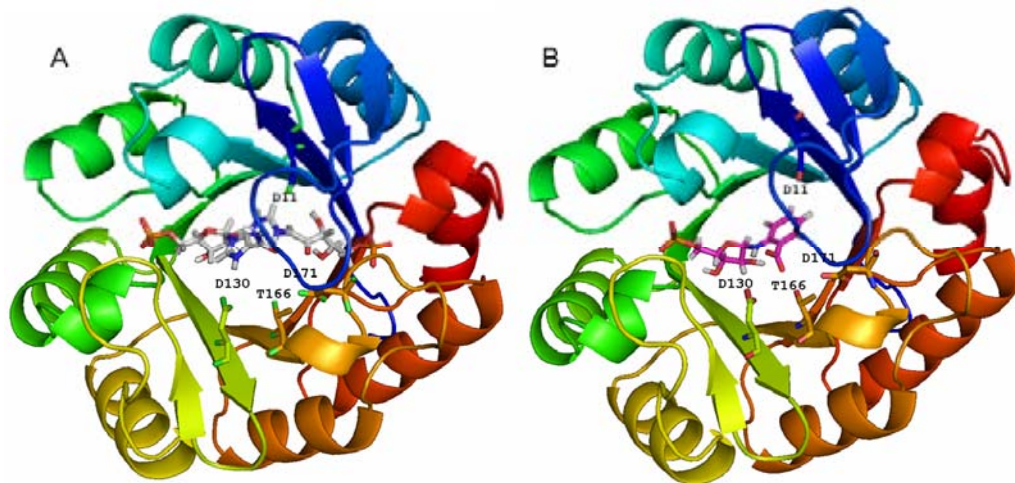


Figura 7-2. Resultados de las simulaciones tipo *docking* del conformero cerrado con PRFAR (A) y PRA (B). La gama de colores de azul a rojo indican los extremos N y C terminal, respectivamente. Las cadenas laterales de los residuos catalíticos se muestran próximas a los ligandos.

Para investigar el papel que llevan a cabo los residuos catalíticos D11 y D130, fueron llevadas a cabo simulaciones de *docking* proteína – ligando. Se utilizaron las estructuras de ambos conformeros de PriA y los ligandos, PRA y PRFAR. Sin embargo, el tamaño de la cavidad en el sitio activo para el caso del conformero abierto es muy grande ($\sim 450 \text{ \AA}^3$); por tal motivo, las simulaciones computacionales no colocan a los ligandos adecuadamente. Resultados coherentes sólo fueron obtenidos con el conformero cerrado, donde el tamaño de la cavidad ($\sim 150 \text{ \AA}^3$) favorece la correcta posición de los sustratos en el sitio activo (Figura 7-2). Congruente con los datos previos de homólogos de HisA, estas simulaciones sugieren que el grupo fosforribosil que será atacado durante la catálisis de PRFAR se une al PBS C-terminal, mientras que solo el PBS N-terminal es responsable de la unión de PRA.

Estos resultados refutan la idea previa de Kuper y colaboradores ⁴⁹, quienes sugieren que PRA podría ser unido en ambos PBS indistintamente.

La orientación que mantienen los sustratos en el sitio activo sugiere que tanto D11 como D130 podrían actuar como ácido o base en la reacción de catálisis, dependiendo del ligando unido. El papel específico de estos residuos fue esclarecido al medir las distancias entre los residuos catalíticos y los ligandos. Cuando ProFAR está unido a la cavidad, D11 se localiza a 5.02 Å del átomo de carbono cuyo protón será abstraído, y por tal motivo actuará como base general, mientras que D130 actuará como ácido general. Cuando PRA está unido en la cavidad, una distancia similar (4.85 Å) es encontrada entre D130 y el carbono atacado, por tal motivo D130 actuará como base y D11 como ácido. Con base en estas observaciones estructurales, un posible escenario mecanístico sería que la bifuncionalidad de PriA estuviese regulada por cambios conformacionales que permitan los diferentes estados de protonación de los residuos catalíticos.

7.1.2. Doble especificidad de sustrato de PriA

Para validar la hipótesis de la especificidad de los PBS por los diferentes sustratos, fueron llevadas a cabo mutaciones en ambos PBS. El PBS N-terminal en PriA está constituido por los residuos SGG en las posiciones 81-83, mientras que en el caso de HisA está constituido por GGG. A pesar de que la S81 interactúa a través de una molécula de agua con el fosfato de los sustratos (a juzgar por el hecho de que pega iones de sulfato; Figura 7-3A), la mutación de este residuo a treonina elimina la actividad TrpF de PriA sin afectar la actividad HisA. A pesar de que el cambio de serina a treonina no es dramático, el carbono extra que tiene el aminoácido treonina pareciera interferir en la correcta localización de PRA en el sitio activo. El caso contrario ocurre al mutar R19, residuo que interactúa directamente con el fosfato en el PBS C-terminal (Figura 7-3B). La mutante

R19A pierde por completo la actividad HisA, mientras que la actividad TrpF se ve inclusive favorecida. Estos resultados son concluyentes en lo que respecta a la unión de PRA y ProFAR en el sitio activo (Tabla 7-1).

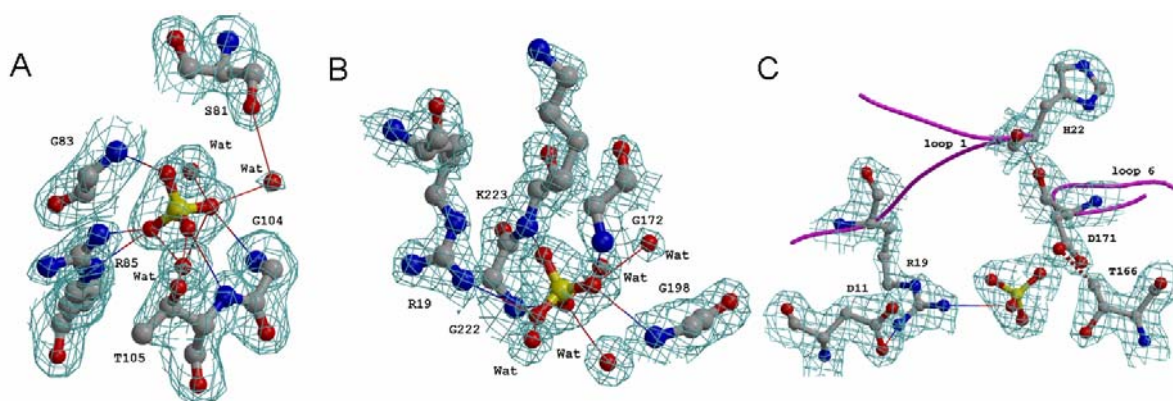


Figura 7-3. Interacciones moleculares claves de PriA. Los puentes de hidrógenos son dibujados como líneas delgadas. (A) PBS N-terminal, incluyendo S81. (B) PBS C- terminal, incluyendo R19. (C) Con una línea roja discontinua se indica el contacto inusual entre T166 y D171 (2.57 Å). El residuo D130 fue omitido para permitir la visualización de dicho contacto, en caso de ser incluido estaría localizado en frente de T166 y D171.

7.1.3. Switch molecular para modular la bifuncionalidad de PriA

El residuo T166 es catalíticamente relevante para las enzimas HisA²²; sin embargo, el papel que dicho aminoácido lleva a cabo es aun desconocido. Congruente con esto, y a pesar de que dicho residuo no interactúa con los sustratos, la mutante T166A en PriA carece de ambas actividades. Es de notarse que la presencia de densidad electrónica en la asa 6 de PriA (confórmero cerrado), permitió observar interacciones nunca antes notadas para HisA y sus homólogos. Entre éstas destacan un contacto inusual (2.57 Å) entre T166 y D171, y un puente de hidrógeno entre H22 y D171 (Figura 7-3 C). Consistente con esto, la pérdida de la actividad HisA y el decremento en la actividad TrpF en la mutante D171A sugieren un papel funcional para este residuo.

Debido a que dichas interacciones no existen en el confórmero abierto, resulta llamativo especular que la interacción entre las asas 1 y 6, y el contacto inusual entre D171 y T166, podrían estar asociados a un mecanismo para controlar los cambios conformacionales que parecen ser prerequisites para la bifuncionalidad de PriA. Por tal motivo, y a pesar de que dichos residuos (T166 y D171) no forman parte del grupo de residuos catalítico, y en cambio pareciera que están formando parte de lo que hemos llamado un *switch* molecular, las mutaciones en dichas posiciones resultan perjudiciales para ambas actividades. Los datos obtenidos para PriA son congruentes con observaciones anteriores que reflejan el papel crucial que juegan las asas $\beta \rightarrow \alpha$ en la función de los barriles $(\beta\alpha)_8$ ³⁸.

7.2. Comparaciones entre PriA y Neo-HisA

En el apartado anterior se elucidó estructuralmente el mecanismo de reacción a través del cual PriA lleva a cabo ambas actividades. A pesar de que PriA fue caracterizada funcionalmente, la existencia de las enzimas neo-HisA, cercanas a PriA en secuencia y evolutivamente (proviene del mismo clado taxonómico), representan la posibilidad de esclarecer el proceso evolutivo de adquisición y especialización de la función enzimática que ha sufrido este grupo de homólogos. Debido a que la secuencia de aminoácidos de PriA no muestra diferencias significativas con respecto a la familia de secuencias de HisA (a excepción del residuo S/G81²), fue necesario adoptar otro acercamiento (intra-cladístico) en donde las distancias evolutivas fueran menores. En el anexo 10.3 se muestran alineamientos múltiples de secuencias realizados utilizando las secuencias de aminoácidos de PriA, HisA y neo-HisA que resultan consistentes con esta última hipótesis.

² Este residuo pudiera dar explicación al origen de la actividad TrpF.

	5	15	25	35	45	55
Blon	-----MSL	TLLPAVDVVD	GKAVRLRQGE	SGSETDYGSP	FEAARTWVEA	GAEWIHLVDL
Scoe	-----MSKL	ELLPAVDVVD	GQAVRLVHGE	SGTETSYPSP	LEAALAWQRS	GAEWLHLVDL
Cjei	MASTDNSRAL	TLLPAVDVAD	GQAVRLVQGA	AGTETSYPSP	IEAALAWQNA	GAEWIHLVDL
Cure	-MSHNTTTAL	TLLPAVDVSE	GQAVRLVQGE	AGTETSYPSP	IEAALAWQNA	GAEWIHLVDL
Cdip	-----MTF	TLLPAVDVVD	GQAVRLDQGE	AGTEKSYGSP	IAAALKWQEQ	GASWLHFVDL
Ceff	-----MTF	TILPAVDVVN	GQAVRLDQGE	AGTEKSYGTP	LESALRWQEQ	GAEWLHFVDL
Cglu	-----MTF	TILPAVDVVN	GQAVRLDQGE	AGTEKSYGTP	LESALKWQEQ	GAKWLHFVDL

	65	75	85	95	105	115
Blon	DAAFGTGNR	DQLREIVHEL	GDRVNIELSG	GVRDDASLDA	ALEAGAARVN	IGTAALENPD
Scoe	DAAFGTGDNR	ALIAEVAQAM	D--IKVELSG	GIRDDDTLAA	ALATGCTRVN	LGTAALETPE
Cjei	DAAFGRGSNF	ELLKEVTGQL	D--VNVELSG	GIRDDSLER	ALSTGCRRVN	IGTAALEDPE
Cure	DAAFGRGSNF	EIHEVTQAM	D--LKVELSG	GIRDDASLER	ALSTGCRRVN	IGTAALENPE
Cdip	DAAFNRGSNH	ELMAEVVKNL	D--INVELTG	GIRDDASLKR	ALATGARRVN	IGTAALEKPE
Ceff	DAAFNRGSNH	ELMAEITRQL	D--IKVELTG	GIRDDASLER	ALATGATRVN	IGTAALEKPE
Cglu	DAAFNRGSNH	EMMAEIVGKL	D--VDVELTG	GIRDDSLER	ALATGARRVN	IGTAALEKPE

	125	135	145	155	165	175
Blon	WTASVIKKYG	DRVAVGLDVR	GHT---LAA	RGWTRGGDL	FETMKFLDSV	GCSRYVVTDV
Scoe	WVAKVIAEHG	DKIAVGLDVR	GTT---LRG	RGWTRDGGDL	YETLDRLNKE	GCARYVVTDI
Cjei	WCESVISRYG	DKVAIGLDTR	EVDGEWRLRG	RGWTSDDGGEL	WEVLERLDSQ	GVSRLVVTDV
Cure	WCKKIIQEHG	DKVAIGLDTR	EVDGEWRLRG	RGWTSDDGGNL	WEVLERLDAE	GVSRLVVTDV
Cdip	WIEKVLGEYG	DAIAVDIAVR	NIDGQWRTRG	NGWVSDGGDL	WEVLERLDSQ	GCTRFVVTDV
Ceff	WIADVIRRHG	EKIAVDIAVR	LENGEWRTRG	NGWVSDGGDL	WEVLERLDSQ	GCSRFFVVTDV
Cglu	WIASAIQRYG	EKIAVDIAVR	LEDGEWRTRG	NGWVSDGGDL	WEVLERLDSQ	GCARFVVTDV

	185	195	205	215	225	235
Blon	AKDGMMSGPN	IQLLSEVAER	TDAPVVASGG	ISKLDDLRAI	KELAEIGVDS	AILGKSLYAR
Scoe	AKDGTLLQGN	LELLKNVCAA	TDRPVVASGG	VSSLDDLRAI	AGLVPAGVEG	AIVGKALYAK
Cjei	SRDGMMLGNP	IDLLREVAAS	TDAPVVASGG	ISSLDDIRAL	AAVVHEGVDS	AIVGKALYAG
Cure	SRDGMMLGNP	VELLREVSAA	TSAPVVASGG	ISSLDDIRAL	AAVVDEGVDS	AIVGKALYAG
Cdip	SKDGTLSGPN	IDLLRDVSAA	TDAPVVASGG	ISTLEDVLEL	ARYEDEGIDS	AIIGKALYEG
Ceff	SKDGTTLTGN	VDLLRDVAAA	TDAPIVASGG	ISTLEDVLEL	AKYQDEGIDS	VIIGKALYEH
Cglu	SKDGTLSGPN	VELLREVAAS	TDAPIVASGG	ISVLEDVLEL	AKYQDEGIDS	VIIGKALYEH
				
	245	255				
Blon	AFTLQEALEV	AK-----				
Scoe	AFTLEEALAA	TS-----				
Cjei	KFTLEEALAA	AQGVARGSDI				
Cure	KFTLEEALRI	ARGQED----				
Cdip	RFTLKEALAA	L-----				
Ceff	RFTLAEALAA	VEKLG----				
Cglu	KFTLEEALAA	VEKLG----				

Figura 7-4. Alineamiento de secuencias entre homólogos selectos de PriA y neo-HisA.

Los residuos identificados se muestran en azul para PriA y en rojo para neo-HisA. En el anexo 10.3 puede observarse el alineamiento entre las secuencias de todos los homólogos de PriA y Neo-HisA disponibles en las bases de datos públicas. Las mutaciones planteadas a partir de PriA son: L4F, V21D, T29K, L51F, G59N, I67M, S81T, T110K, G128D, D130A, L136T, R139N. Leer texto para más detalle.

La alta identidad que comparten las secuencias de las sub-familias neo-HisA y PriA (70%) permitió la identificación de 13 residuos diferentes entre estas. La existencia de un ortólogo de PriA bifuncional en los genomas

de *C. jeikenium* y *C. urealyticum* demuestra que estas diferencias a nivel de secuencia no son el resultado de la distancia evolutiva entre los géneros *Streptomyces* y *Corynebacterium*. Tomando en cuenta esta observación, es tentador especular que dichos reemplazos naturales están posiblemente asociados a la bifuncionalidad de PriA y no a mutaciones neutrales ocurridas después de la especiación del género *Corynebacterium*. Como se puede ver en el alineamiento de la Figura 7-4, las 13 mutaciones planteadas pueden ser identificadas incluso en los ortólogos cercanos de *C. jeikenium* y *C. urealyticum*.

7.2.1. Posible naturaleza evolutiva de los trece reemplazos

Con el objetivo de explorar la naturaleza evolutiva de dichos reemplazos naturales, los alineamientos se analizaron utilizando el software PAML. Este programa permite elucidar el tipo de proceso evolutivo al cual un gen ha estado sometido, a juzgar por la relación que se detecte entre el número de mutaciones sinónimas con respecto a las no sinónimas. Específicamente, el objetivo consistió en detectar en las secuencias de neo-HisA aquellos residuos bajo selección positiva, mismos que podrían estar asociados a la pérdida de TrpF. Las secuencias utilizadas en el análisis filogenético provienen de los actinomicetos cuyos genomas han sido secuenciados hasta la fecha. Del total de 75 genomas secuenciados hasta octubre del 2007, se excluyeron aquellos que en una matriz de identidad realizada con las secuencias de PriA, compartieran más del 90% de identidad. Todos los árboles realizados se llevaron a cabo con 41 secuencias de actinomicetos representativos (ver anexo 4). A pesar de que en el árbol filogenético que se muestra en la Figura 7-5 las dos secuencias de neo-HisA que se incluyen parecieran estar divergiendo, este acercamiento bioinformático no logró encontrar ningún residuo que se encontrase bajo selección positiva.

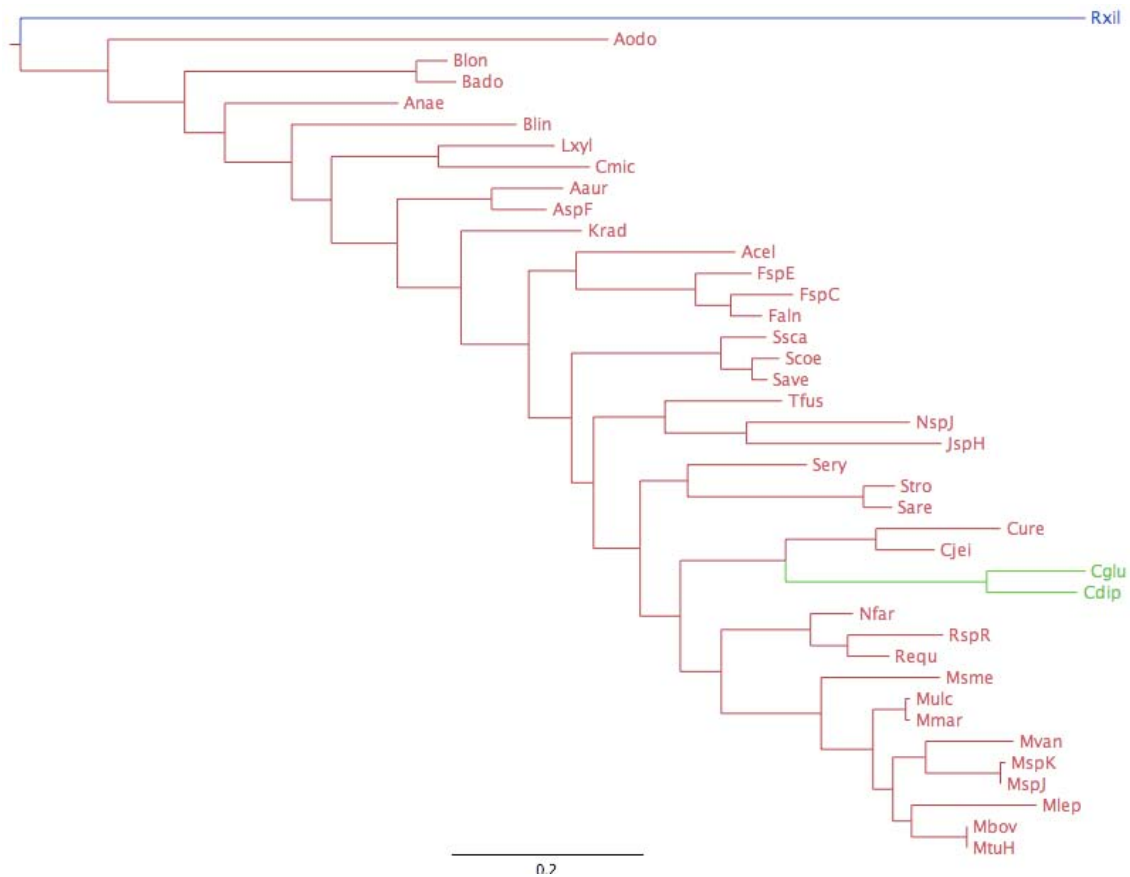


Figura 7-5. Dendrograma de homólogos de PriA construido a partir de la secuencia de aminoácidos. En verde se indican las neo-HisA, en rosa a PriA y en azul a HisA. Los nombres completos de los microorganismos utilizados se indican en el anexo 10.4.

Previamente se ha establecido que las mutaciones que conllevan a la adquisición de una actividad enzimática son fijadas tras un proceso de selección positiva. Este podría ser el caso entre PriA y HisA, sin embargo, entre PriA y neo-HisA el proceso evolutivo es diferente, debido a que ninguna actividad enzimática ha sido adquirida. En este contexto, es importante señalar que el proceso evolutivo por el que atraviesa una enzima generalista, como PriA, hacia la especialización de alguna actividad enzimática no es equiparable al proceso de adquisición de la función *per se*, donde mediante selección positiva se fija la nueva función (de HisA a PriA). Durante el proceso de especialización de PriA a neoHisA la única presión selectiva que actúa es negativa, principalmente hacia mantener la actividad HisA, lo cual permite que ocurran mutaciones que afecten la actividad TrpF¹³. De esta reflexión se deriva el modelo evolutivo que se esquematiza en la

Figura 7-6, mismo que se adopta para el desarrollo de las subsiguientes secciones de esta tesis.

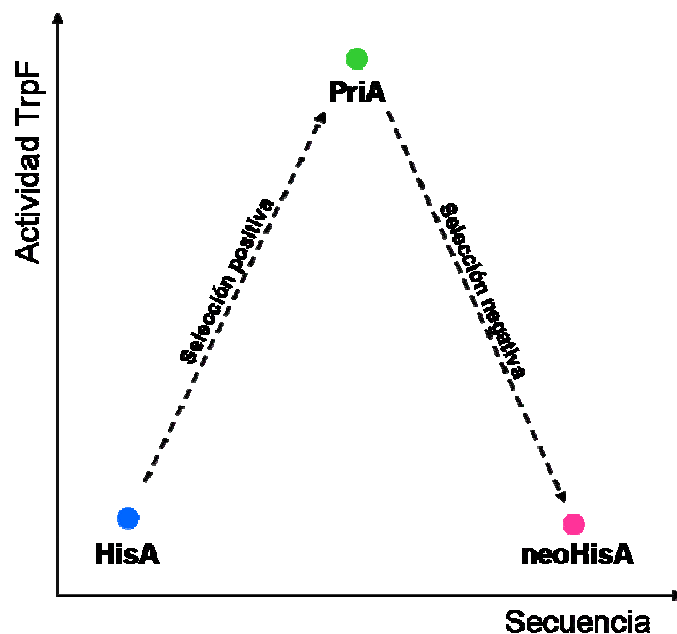


Figura 7-6. Hipótesis del proceso evolutivo ocurrido entre HisA – PriA – neo-HisA. Todos los puntos en la gráfica tienen la misma actividad HisA. Leer el texto para más detalles.

7.2.2. Explorando residuos involucrados en la bifuncionalidad de PriA

Debido a que dos de las 13 mutantes detectadas (S81T y D130A) resultan congruentes con el análisis previamente realizado de la relación estructura – función de PriA, y han sido discutidas anteriormente, no serán retomadas en el presente apartado. Las 11 mutaciones puntuales restantes: L4F, V21D, T29K, A37S, L51F, G59N, I67M, T110K, G128D, L136T y R139N, fueron realizadas en el gen *priA* de *S. coelicolor*. Dichas mutantes fueron utilizadas para complementar las actividades de HisA y TrpF en cepas de *E. coli* que carecen individualmente, cada uno de estos genes. Los resultados de las actividades de dichas mutantes se indican en la tabla 7-2.

Tabla 7-2 Actividades de mutantes puntuales de PriA diseñadas a través del acercamiento evolutivo.

Mutante	Actividad TrpF ^a	Tiempo (hrs) ^b	Actividad HisA ^a	Tiempo (hrs) ^b
Silvestre	1	31	1	40
L4F	0.5	43	0.78	46
V21D	0.8	34	0	nc
T29K	0.95	36	0.91	66
A37S	0.75	36	0.76	58
L51F	0.1	47	0	nc
G59N	0.79	30	0.73	87
I67M	0.76	31	0.86	59
T110K	0.99	31	0.93	44
G128D	0.47	46	0	nc
L136T	0.1	86	0.69	79
R139N	0	nc	0.97	61
Control (-)	0	nc	0	nc

(a) El valor corresponde a la relación de UFC entre LB y medio mínimo y normalizado con el valor de la enzima silvestre. (b) Tiempo ocurrido para la aparición de las colonias (tamaño = 0.1 mm); nc: no complementó. En rojo las mutantes que afectan principalmente la actividad HisA, en azul mutantes que afectan principalmente la actividad TrpF y en verde mutaciones que afectan ambas actividades.

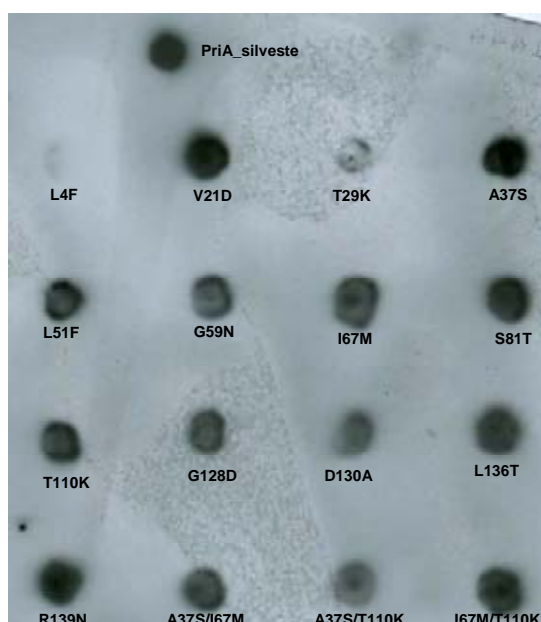


Figura 7.7. Análisis de la expresión *in vivo* de PriA y mutantes (CoFi Blot). En esta imagen en particular no se demuestra claramente la solubilidad de L4F. Sin embargo, el experimento fue repetido 2 veces consecutivas y se comprobó la solubilidad de la mutante L4F (resultados no mostrados).

Para comprobar que dichas mutaciones no afectan la estabilidad o el plegamiento de la enzima, se demostró su integridad mediante CoFi Blot (ver materiales y métodos) (Figura 7.7).

Como puede observarse en la tabla 7-2 la mayoría de las mutaciones realizadas (a excepción de A37S, I67M y T110K) tiene un efecto directo en alguna o ambas actividades enzimáticas.

Es importante hacer notar que durante la identificación de dichas mutaciones, ningún elemento estructural fue tomado en cuenta. Sin embargo, al analizar la localización estructural de dichos residuos, se observa que todos, a excepción de L4F, se encuentran en la cara catalítica del barril (Figura 7.8) y sobre todo que los fenotipos encontrados están estrechamente relacionados a la posición de los residuos mutados.

Las mutaciones en las asas de la mitad N-terminal del barril: V21D (asa 1), T29K (asa 1) y G59N (asa 2), afectan principalmente la actividad HisA; mientras que las mutaciones localizadas en las asas de la mitad C-terminal: L136T (asa 5) y R139N (asa 5) afectan la actividad TrpF de PriA. Las mutaciones realizadas en las hojas β , lo cual corresponde al núcleo del barril, afectan ambas actividades (L51F y G128D) y todas las mutaciones realizadas en las hélices α , por ende lejano al sitio activo o a las asas funcionales resultan en fenotipos silvestres (A37S, I67M y T110K). Dichas observaciones resultan congruentes con los fundamentos establecidos acerca de la relación estructura – función de los barriles $(\beta\alpha)_8$, donde se ha establecido que la catálisis y unión de sustratos es llevada a cabo por el núcleo catalítico formado por los extremos C-terminal de las hojas beta y por las asas $\beta \rightarrow \alpha$ ³⁸.

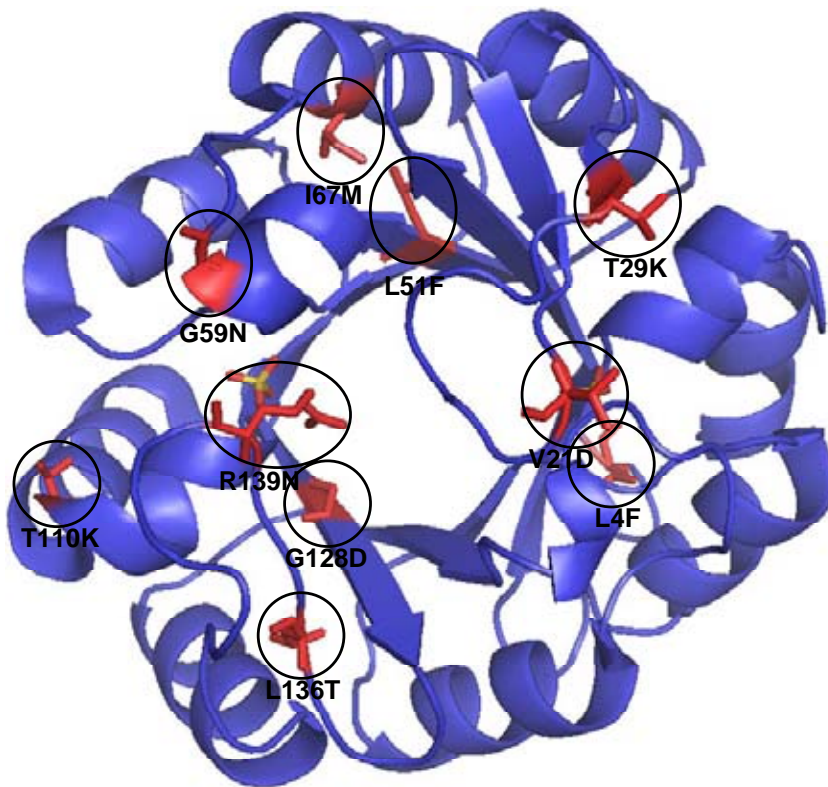


Figura 7.8. Localización estructural de los residuos mutados en PriA de *S. coelicolor*. Los iones de sulfatos se indican en amarillo.

Como se ha establecido previamente, los residuos encargados de llevar a cabo la catálisis en PriA son los mismos que en el homólogo monofuncional HisA ⁵⁰. Por este motivo, las mutaciones que afecten la integridad de la cavidad catalítica (G128D, D130A) afectan severamente ambas actividades. Es interesante hacer notar que a diferencia de dichos fenotipos, es posible encontrar mutantes cuyo efecto en la bifuncionalidad resulta más especializado. Tal es el caso de las mutaciones realizadas en el asa 1 (V21D, T29K), localizada sobre el PBS C-terminal, cuyo papel específico de unión del sustrato ProFAR ha sido determinado en este trabajo ⁵⁰. Dichas mutaciones reducen dramáticamente la actividad HisA de PriA, manteniendo intacta la actividad TrpF. Lo contrario ocurre con las mutaciones en el asa 5, sin embargo, en este caso también se ha comprometido la actividad HisA. El asa 5 se encuentra localizada sobre el PBS N-terminal y como se ha mencionado anteriormente, dicho sitio de unión a fosfato une a ambos sustratos (PRA y ProFAR) ⁵⁰. Por tal motivo ambas actividades se han afectado.

Resulta muy interesante notar el papel fundamental de las asas en el caso de PriA. Previamente se ha establecido y demostrado que el intercambio de asas en diferentes proteínas puede generar la ganancia de nuevas funciones enzimáticas ⁷⁷. Y pareciera ser el caso de PriA, donde la adquisición de la actividad TrpF podría estar mediada por la obtención de mutaciones puntuales, principalmente en las asas funcionales de este barril.

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad HisA de PriA es 10 veces menor comparada con sus homólogos monofuncionales ⁴⁹. Siguiendo las teorías evolutivas que establecen que la ganancia de la nueva actividad en las enzimas viene a expensas de la función original ¹⁰, se esperaba encontrar mutaciones puntuales que reestablecieran los niveles de la actividad HisA, o al contrario mutaciones que eliminaran la actividad TrpF, sin comprometer la actividad HisA.

7.2.3. Rol de la epistasis en el proceso evolutivo de PriA

El término epistasis fue utilizado inicialmente para describir el tipo de interacción entre genes situados en distintos loci en un mismo cromosoma, que consiste en que cada gen puede enmascarar o suprimir la expresión del otro. En las proteínas se utiliza para describir las interacciones entre las mutaciones ocurridas en una secuencia, y consiste en que el rol de alguna de ellas puede estar suprimido o exaltado por otra ⁷⁸. Dado que existen mutaciones puntuales, que en el contexto genético de *Corynebacterium* (i.e. neo-HisA) no nulifican la actividad HisA, y otras que no tienen efecto sobre alguna de las dos funciones en *priA* de *S. coelicolor*, se puede inferir indirectamente la existencia de un proceso epistático. Debido a que realizar una estrategia de búsqueda exhaustiva entre las diferentes combinaciones excede los límites del presente trabajo, se planteó como estrategia inicial realizar dobles mutantes. Para esto se eligieron aquellos residuos que *per se* no afectan ninguna de las funciones enzimáticas en PriA, i.e. A37S, I67M

T110K. Las dobles mutantes A37S/I67M, A37S/T110K, I67M/T110K fueron construidas en el gen *priA* de *S. coelicolor* y el efecto de las mismas fue evaluado a través de ensayos de complementación (Tabla 7-3). De la misma manera que con las mutantes puntuales, la falta de actividad no está asociada a un problema de solubilidad, como lo demuestran los resultados obtenidos con los experimentos de *CoFi Blot* (Figura 7.7).

Como se muestra en la tabla 7.3, se encontraron diferentes fenotipos entre las distintas combinaciones de dobles mutantes realizadas. Sólo cuando se tiene la mutación A37S en el contexto de una doble mutante, se afecta la función de PriA. Sin embargo, se observan diferentes resultados cuando una segunda mutación es adquirida en la mutante sencilla A37S. En el caso de A37S/I67M solo la actividad de TrpF se afectó. Anteriormente al presente trabajo se había obtenido fortuitamente la mutante A37V/I67M, que se utilizó para introducir selenometionina en la posición 67 y resolver el problema de las fases en cristalografía, y es por este motivo que se tiene la estructura de esta doble mutante (ver sección 7.1). La caracterización funcional de la misma demostró la ausencia de ambas actividades (resultados no mostrados), ya que la única diferencia entre la mutante cristalizada y la realizada en el presente trabajo es la dirección de la mutación en el residuo 37, se puede concluir que la dirección de las mutaciones en los residuos planteados tiene importancia funcional.

Tabla 7-3 Actividades de dobles mutantes de PriA

Mutante	Actividad TrpF ^a	Tiempo (hrs) ^b	Actividad HisA ^a	Tiempo (hrs) ^b
Silvestre	1	31	1	40
A37S/I67M	0	nc	1	72
A37S/T110K	0	nc	0	nc
I67M/T110K	0.75	31	1	47
Control (-)	0	nc	0	nc

^(a) El valor corresponde a la relación de UFC entre LB y medio mínimo y normalizado con el valor de la enzima silvestre. ^(b) Tiempo ocurrido para la aparición de las colonias (tamaño = 0.1 mm); nc: no complementó. En azul mutantes que afectan principalmente la actividad TrpF y en verde mutaciones que afectan ambas actividades.

Es de destacarse que, cuando en el contexto de A37S se incluye la mutación T110K, PriA pierde ambas actividades. Como la doble mutante I67M/T110K mantiene las actividades silvestres, la relevancia de estos residuos sólo puede ser medida en un contexto donde otras mutaciones, como A37S, han sido adquiridas previamente. Analizando los alineamientos múltiples de secuencia entre los homólogos de PriA, se puede notar que tanto I67 como T110 difieren del consenso, el cual se define como el nivel de identidad en una posición en el alineamiento múltiple de secuencias. Previamente se ha demostrado que este tipo de mutaciones (*back to consensus*) aumentan la estabilidad de las proteínas ^{79; 80}, y su función podría estar asociada a un aumento en la robustez³. Las posibles implicaciones de esto pueden ser, o bien adquirir mutaciones previamente deletéreas, o recuperar la estabilidad comprometida por mutaciones previamente adquiridas ⁸¹. Para comprobar que mutaciones como I67M y T110K existen para recuperar estabilidad o solubilidad, sería interesante medir la temperatura de desnaturalización (T_m) de mutantes sencillas que han comprometido alguna de las funciones, y compararla con los datos de T_m de mutantes dobles que incluyan algunos de estos residuos potencialmente estabilizadores. En este contexto, llevar a cabo una mutagénesis combinatoria completa involucrando los 13 residuos se presenta como un experimento atractivo.

7.2.4. Caracterización bioquímica de PriA y mutantes puntuales

La actividad TrpF de PriA, como se ha discutido en otras secciones de esta tesis, resulta el atributo enzimático más atractivo de esta proteína. La existencia de un ensayo rápido para medir la esta actividad específica de TrpF, el cual fue previamente desarrollado por otros miembros del laboratorio donde se realizaron los trabajos de esta tesis ⁶⁹, permitió

³ El término robustez hace referencia al nivel de tolerancia de un sistema biológico ante los cambios. En este caso, se refiere a la tolerancia de las proteínas a ser mutadas.

caracterizar parcialmente a PriA y sus mutantes (Tabla 7.4). Sin embargo, la hidrólisis espontánea de PRA en ácido antranílico y ribosa-5-fosfato, provoca que la medición experimental de las constantes cinéticas de las enzimas con actividad TrpF sea inexacta y técnicamente complicada ^{22; 71}. Por esto, la determinación de los parámetros cinéticos de PriA y sus mutantes, concretamente en términos de la actividad TrpF, quedó fuera del alcance del presente trabajo.

Tabla 7-4 Actividades TrpF de PriA y mutantes medida *in Vitro*.

Enzima	Actividad específica (%) ^a
PriA	100
PriA_L4F	75
PriA_V21D	95
PriA_T29K	103
PriA_A37S	82
PriA_L51F	n.e. ^b
PriA_G59N	74
PriA_I67M	89
PriA_S81T	0
PriA_T110K	40
PriA_G128D	14
PriA_D130A	3
PriA_L136T	0
PriA_R139N	0

^a El valor reportado corresponde al promedio de tres experimentos normalizados contra el valor obtenido para la enzima silvestre. La actividad de la enzima silvestre y mutantes fue medida en unidades de Abs / min.

^b n.e., no se expresa.

Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron las mutantes construidas en el vector pET-4T1, en donde las proteínas están fusionadas a una “cola” de histidina en el extremo amino terminal. El sustrato PRA es sintetizado químicamente *in situ* a partir de una mezcla de ácido antranílico y ribosa-5-fosfato en 50% etanol (ver materiales y métodos 6.6.1). Debido a que la cantidad de PRA formado en cada ocasión es diferente, y no hay manera de cuantificarlo apropiadamente, todas las mutantes fueron expresadas y

purificadas por su afinidad a níquel simultáneamente (según condiciones descritas en métodos, sección 6.6.3).

Como se observa en la figura 7.9, la pureza de las enzimas es inferior al 50%. Esto se debe principalmente a la pobre expresión de PriA en el sistema anteriormente estandarizado ⁶⁹ y al bajo rendimiento obtenido después de la purificación por afinidad a níquel. Peor aún, la expresión de las mutantes entre sí no es equivalente, y debido a la falta de una metodología que permita conocer la concentración específica de PriA después de la purificación, los datos de actividad que se reportan en la Tabla 7.4 son dependientes de las diferencias en el nivel de expresión entre las mutantes.

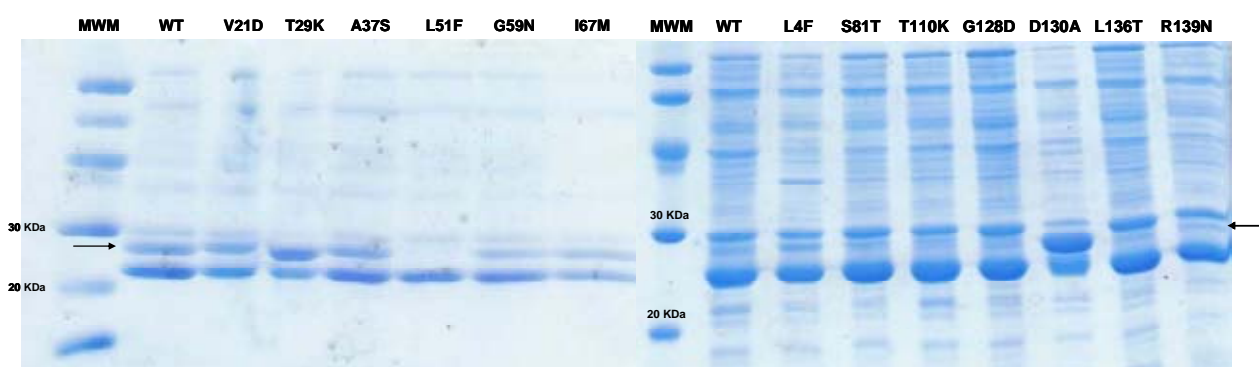


Figura 7.9. Expresión y purificación de PriA y mutantes. La enzima PriA silvestre y las 13 mutantes realizadas fueron expresadas y purificadas por afinidad a Níquel. La flecha indica la banda correspondiente a PriA (26 kDa).

Por ejemplo, como se puede observar en la figura 7.9, la mutante PriA_L51F no se expresa, por lo cual no se puede medir su actividad TrpF *in Vitro*. Así mismo, en esta figura, se puede observar que los niveles de expresión de las mutantes PriA_G59N, PriA_I67M y PriA_T110K no son equivalentes a los observados para la enzima silvestre. El caso contrario ocurre en las mutantes PriA_L4F, PriA_T29K y PriA_D130A. Sin embargo, a pesar de las diferencias en las cantidades de enzima obtenida, los resultados son consistentes con lo que se encontró previamente en los ensayos de complementación. Las mutantes PriA_S81T, PriA_G128D, PriA_D130A, PriA_L136T y PriA_R139N, cuya actividad TrpF medida *in*

vivo por complementación ha sido afectada, presentan una actividad específica menor al 20%, lo que difícilmente puede estar relacionado a los niveles de expresión.

7.2.5. Caracterización estructural de PriA y mutantes

Con el objetivo de comprobar la relevancia funcional de las asas en PriA, se prosiguió con la caracterización estructural de las mutantes monofuncionales. Las mismas condiciones de expresión, purificación y cristalización previamente estandarizadas para la enzima PriA silvestre ⁶⁹ fueron utilizadas para las mutantes sencillas. Como se ha mencionado anteriormente, todas las mutantes pueden ser expresadas a excepción de L51F. Por otro lado, la baja pureza de las muestras después de la purificación a través de la afinidad al níquel, exigía un segundo paso de purificación. Para esto, se llevó a cabo cromatografía de exclusión molecular. Como se muestra en la figura 7.10, las mutantes V21D, G59N, G128D y L136T no pudieron ser purificadas apropiadamente. En el caso de estas últimas el peso molecular de la proteína purificada es mayor al esperado; a pesar de las diferencias en el tamaño de las proteínas, el tiempo de elusión de ambos productos es muy cercano, impidiendo la separación de los mismos (Figura 7.10).

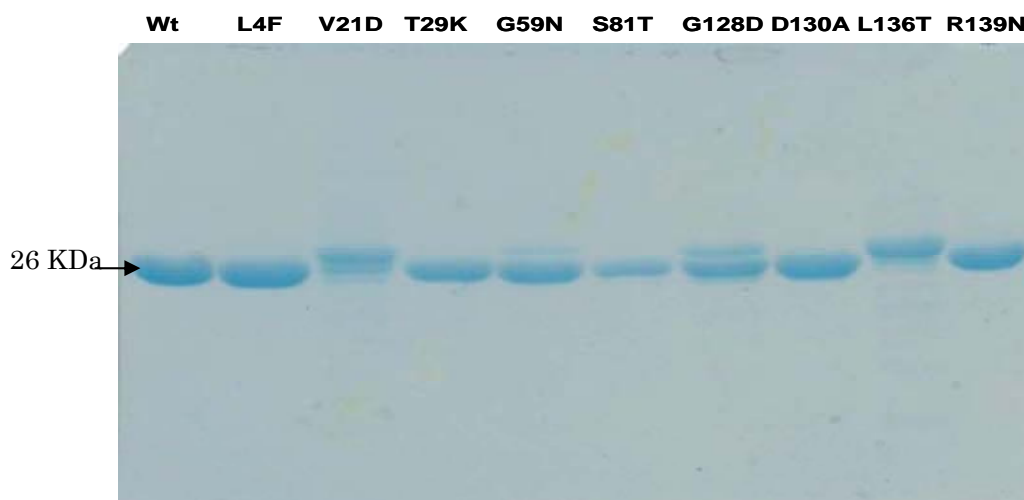


Figura 7.10. Purificación a homogeneidad de PriA y mutantes usando cromatografía de exclusión molecular.

Siguiendo las condiciones de cristalización de PriA se obtuvieron cristales para las mutantes T29K, G128D, D130A y R139N (Tabla 7.5 y Anexo 10.6). A pesar de la alta pureza de las muestras L4F y S81T, dichas mutantes no formaron cristales en las condiciones previamente establecidas para la enzima silvestre. Por otro lado, debido a la baja resolución obtenida para los cristales de las mutantes G128D y D130A al ser difractados en el ánodo rotatorio, tan solo los cristales de las mutantes T29K y R139N fueron recolectados y difractados en el ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), Grenoble, Francia [Línea BM14, longitud de onda: 1.0359 Å, detector MAR CCD]. De estas dos mutantes, solo para R139N se pudieron recolectar un número adecuado de datos, cuyas características cristalográficas se indican en la tabla 7.5

Tabla 7-5 Condiciones de cristalización de las mutantes de PriA y datos cristalográficos de PriA_R139N.

T29K	
Condiciones de Cristalización	Sulfato de Amonio 1.45M, Citrato de Sodio 100mM pH4.8.
G128D	
Condiciones de Cristalización	Sulfato de Amonio 1.55M, Citrato de Sodio 100mM pH4.8.
D130A	
Condiciones de Cristalización	Sulfato de Amonio 1.5M, Citrato de Sodio 100 mMpH4.8.
R139N	
Condiciones de Cristalización	Sulfato de Amonio 1.5M, Citrato de Sodio 100mM pH4.8.
Datos colectados	
Sincrotrón, detector y longitud de onda (Å)	ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), Grenoble, Francia [Línea BM14, longitud de onda: 1.0359 Å, detector MAR CCD]
Grupo espacial	P3 ₁ 21
Celda unitaria (<i>a</i> y <i>c</i> , Å)	63.6 63.6 102.9 90.0 90.0 120.0
Intervalo de resolución (Å)	27.95 – 1.95
Observaciones	867281
Reflexiones únicas	17365
Rmerge ^a total y Rmerge en la faja externa	
Integridad (%)	99.62
Refinamiento	
Número de átomos	1846
R _{cryst} ^b	0.216
R _{free} ^c	0.276
Reflexiones usadas en el grupo free	(5%)
R _{cryst} (todos los datos) ^a	0.218
Promedio de factores de temperatura (Å ²)	39.21
Rmsd de datos ideales:	
Enlaces (Å)	0.016
Ángulos (o)	1.389
DPI coordinate error (Å)	0.18

^a $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \{I(hkl)\}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, donde $\{I\}$ representa los valores de la intensidad e difracción individuales y en promedio. La sumatoria es sobre todas las reflexiones únicas.

^b $R_{cryst} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$ donde F_{obs} y F_{calc} son los factores de amplitud observados y calculados, respectivamente.

^c R_{free} es equivalente a R_{cryst} para el 5% de las reflexiones no usadas en el refinamiento.

Al comparar las estructuras de PriA silvestre y PriA_R139N pueden encontrarse grandes diferencias, principalmente en la orientación de las cadenas laterales de los residuos localizados en las asas $\beta \rightarrow \alpha$ 1, 5 y 6, y en los valores de los factores de temperatura de las mismas (*B factors*). En la Figura 7.10 B se muestra el modelo 3D obtenido para esta mutante. Recurrentemente, cuando se trata de dar explicación a los movimientos de ciertas estructuras o residuos en las proteínas se hace referencia a los valores de los factores de temperatura, mismos que si son más grandes del promedio de dicha estructura, o simplemente inexistentes, indican un incremento en la flexibilidad de la zona en cuestión ⁸². En este contexto, la estructura de PriA_R139N resulta sumamente informativa, en particular en relación al rol que las asas pudieran tener en la bifuncionalidad de PriA, como se discute a continuación.

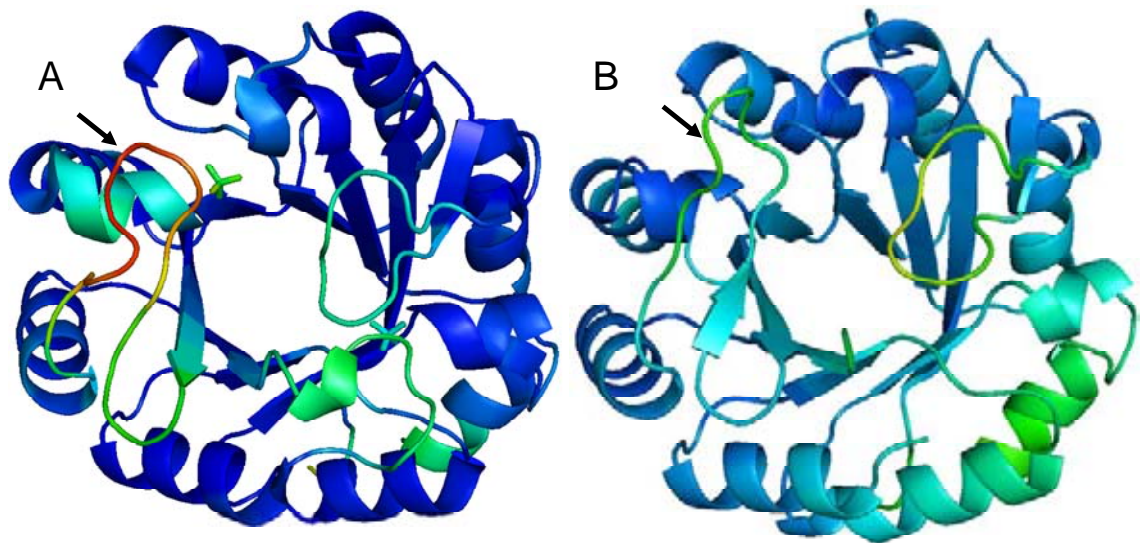


Figura 7.10. Modelo 3D de PriA silvestre (A) y mutante R139 (B). El incremento en el valor de los factores de temperatura está indicado por el gradiente de azul a rojo. Con una flecha negra se indica la posición del asa 5.

Como se ha mencionado, la mutación R139N se localiza en la asa 5, cuya relevancia funcional fue establecida previamente. Es importante recalcar que PriA_R139N carece de actividad TrpF. De manera inicial puede observarse que cuando esta mutación está presente, existe un decremento significativo en los factores *b* de esta asa (Figura 7.10). Esto contrasta con los valores altos en la factores *b* de esta asa en las estructuras silvestres de

PriA disponibles (PDB: 2VEP y 1VZW). El decremento de flexibilidad en dicha asa en la mutante R139N correlaciona con la pérdida de la actividad TrpF, lo que implica que en ausencia de la movilidad característica del asa 5, la capacidad catalítica de PriA se ve seriamente comprometida.

¿Cómo es que un cambio tan sutil como R139N puede tener un efecto tan drástico en la estructura y función de PriA? Como ya se ha mencionado, este cambio trae como consecuencia un cambio en la flexibilidad del asa 5. Consistente con esto, es interesante notar que el cambio de R por N en esta posición provoca que sólo se forme un puente de hidrógeno con el PBS N-terminal, comparado con los dos puentes de hidrógeno que forma la enzima silvestre (Figura 7-11). Por tal motivo, se puede suponer que los sustratos (PRA y ProFAR) no son unidos con la misma afinidad que en la enzima silvestre, lo anterior podría comprobarse con un ensayo de cinética enzimática, en cuyo caso el valor de K_m debería verse afectado drásticamente. A pesar de que los datos estructurales permiten plantear hipótesis concretas en este sentido, la alta complejidad del ensayo impidió la ejecución de dicho experimento como parte de los objetivos de este trabajo de tesis.



Figura 7-11. Sobre imposición del asa 5 de PriA silvestre (rojo) y PriA_R139N (verde). Se muestran las cadenas laterales de los residuos en la

posición 139. Los puentes de hidrógeno que se forman entre los residuos R (silvestre) y N (mutante) en esta posición con el ion sulfato se indican en negro para R y azul para N.

Como se discute en la introducción, se ha sugerido que en los barriles $(\beta\alpha)_8$ las asas en la mitad catalítica son generalmente más flexibles y responsables de la unión a los diferentes sustratos ⁸³. Debido a esto se ha especulado que pueden ser adquiridas nuevas funciones enzimáticas a partir del mismo plegamiento, simplemente intercambiando las asas entre diferentes proteínas. A pesar de que hasta la fecha no se cuenta con ningún ejemplo de lo anterior, específicamente utilizando barriles $(\beta\alpha)_8$, el intercambio de asas como mediador del cambio en la función enzimática fue posible en un plegamiento diferente ⁷⁷. Las mutantes obtenidas en PriA revelan resultados congruentes con esta hipótesis. Las mutaciones realizadas en las asas catalíticas afectan severamente ambas actividades. En este contexto, actualmente en nuestro grupo se está intentando la inserción de dichas asas de PriA en TrpF (Adrián Ochoa-Leyva y Xavier Soberón) en este grupo de trabajo, bajo el supuesto de que el intercambio de asas podría ser suficiente para generar una enzima TrpF con actividad HisA.

Aunado a esto, podría ser interesante realizar las mutaciones localizadas en las asas, identificadas en PriA, en el gen *neo-HisA*. Debido a la alta identidad de secuencia entre PriA y neo-HisA, la adquisición de dichas mutaciones podría ser suficiente para la adquisición de la actividad TrpF.

8. Conclusiones

Nuestro trabajo aporta los primeros conocimientos acerca de la bifuncionalidad de PriA. Sin bien se sabía que la enzima era capaz de llevar a cabo ambas actividades, el mecanismo de acción era por completo inexplorado. Con las mutantes del sitio activo y las simulaciones de “docking” realizadas se puede concluir que:

(i) los mismos residuos catalíticos D11 y D130 actúan como ácido – base para llevar a cabo la reacción HisA y TrpF, y que el cambio entre las actividades está modulado por un proceso de desprotonación - protonación en estos residuos,

(ii) la unión de PRA se lleva a cabo en el PBS N-terminal a diferencia de la unión de la ribosa catalizada de ProFAR que es unida en el PBS C-terminal, y

(iii) las interacciones entre las asas 1 y 6 de PriA, y T166 y D171 funcionan como un “switch” entre conformeros, permitiendo el movimiento de las asas catalíticas y modulando la flexibilidad de la proteína.

A partir de las comparaciones realizadas entre homólogos monofuncionales y bifuncionales de PriA se concluye que:

(i) la existencia de la actividad TrpF en PriA está modulada por el grupo de residuos identificados que al parecer actúan de manera conjunta.

(ii) Las asas 1 y 5 funcionan como moduladores de la afinidad por los diferentes sustratos. El decremento en la flexibilidad del asa 5 provoca la pérdida de la función enzimática.

9. Perspectivas

El desarrollo de los ensayos enzimáticos TrpF y HisA por otros miembros del laboratorio (Karina Verdel y Aldo Camacho) permitirá en un futuro cercano medir las constantes cinéticas de las mutantes realizadas. Se anticipa que con la adquisición de dichos datos se tendrá una idea concisa acerca de la aportación de cada uno de los residuos analizados a la función de PriA.

Debido a que no se encontró una mutante sencilla que eliminara la actividad TrpF, manteniendo los niveles silvestres de la actividad HisA, es de suponer que sólo a través de la acción concertada de todos los residuos será posible mantener dicho equilibrio entre las actividades TrpF y HisA. Así mismo la mutación de estos 13 residuos en el contexto de neo-HisA no ocasiona ningún efecto en la actividad de la misma (Aldo Camacho Zarco). Por tal motivo resultaría muy interesante realizar una mutagénesis combinatoria de los 13 residuos, bien a partir de PriA o neo-HisA, lo cual se anticipa podría esclarecer por completo la ruta de adquisición de mutaciones que ha ocasionado la pérdida de la actividad TrpF.

10. Referencias

1. Graur, D. a. L., H-W. (2000). *Fundamentals of molecular evolution*. Second edit, Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
2. Ohno, S. (1970). *Evolution by gene duplication*, Springer-Verlag.
3. Tokuriki, N., Stricher, F., Schymkowitz, J., Serrano, L. & Tawfik, D. S. (2007). The stability effects of protein mutations appear to be universally distributed. *J Mol Biol* **369**, 1318-32.
4. Lynch, M., O'Hely, M., Walsh, B. & Force, A. (2001). The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate. *Genetics* **159**, 1789-804.
5. Jensen, R. A. (2001). Orthologs and paralogs - we need to get it right. *Genome Biol* **2**, INTERACTIONS1002.
6. Zhang, J. Z. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 292-298.
7. Zhang, J., Rosenberg, H. F. & Nei, M. (1998). Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3708-13.
8. Hughes, A. L. (1994). The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc Biol Sci* **256**, 119-24.
9. Ohta, T. (1994). Further examples of evolution by gene duplication revealed through DNA sequence comparisons. *Genetics* **138**, 1331-7.
10. Khersonsky, O., Roodveldt, C. & Tawfik, D. S. (2006). Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr Opin Chem Biol* **10**, 498-508.
11. O'Brien, P. J. & Herschlag, D. (1999). Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem Biol* **6**, R91-R105.
12. Bloom, J. D., Romero, P. A., Lu, Z. & Arnold, F. H. (2007). Neutral genetic drift can alter promiscuous protein functions, potentially aiding functional evolution. *Biol Direct* **2**, 17.
13. Bershtein, S., Segal, M., Bekerman, R., Tokuriki, N. & Tawfik, D. S. (2006). Robustness-epistasis link shapes the fitness landscape of a randomly drifting protein. *Nature* **444**, 929-32.
14. Barona-Gomez, F. (2003). University of Warwick.
15. Horowitz, N. H. (1945). On the Evolution of Biochemical Syntheses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **31**, 153-7.

16. Gerlt, J. A. & Babbitt, P. C. (2001). Divergent evolution of enzymatic function: mechanistically diverse superfamilies and functionally distinct suprafamilies. *Annu Rev Biochem* **70**, 209-46.
17. Crawford, I. P. (1989). Evolution of a biosynthetic pathway: the tryptophan paradigm. *Annu Rev Microbiol* **43**, 567-600.
18. Wilmanns, M., Hyde, C. C., Davies, D. R., Kirschner, K. & Jansonius, J. N. (1991). Structural conservation in parallel beta/alpha-barrel enzymes that catalyze three sequential reactions in the pathway of tryptophan biosynthesis. *Biochemistry* **30**, 9161-9.
19. Fani, R., Lio, P., Chiarelli, I. & Bazzicalupo, M. (1994). The evolution of the histidine biosynthetic genes in prokaryotes: a common ancestor for the hisA and hisF genes. *J Mol Evol* **38**, 489-95.
20. Jensen, R. A. (1976). Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu Rev Microbiol* **30**, 409-25.
21. Rison, S. C. & Thornton, J. M. (2002). Pathway evolution, structurally speaking. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 374-82.
22. Henn-Sax, M., Thoma, R., Schmidt, S., Hennig, M., Kirschner, K. & Sterner, R. (2002). Two (beta/alpha)₈-barrel enzymes of histidine and tryptophan biosynthesis have similar reaction mechanisms and common strategies for protecting their labile substrates. *Biochemistry* **41**, 12032-42.
23. Jurgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer, S., Wilmanns, M. & Sterner, R. (2000). Directed evolution of a (beta/alpha)₈-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9925-30.
24. Fani, R., Brilli, M. & Lio, P. (2005). The origin and evolution of operons: the piecewise building of the proteobacterial histidine operon. *J Mol Evol* **60**, 378-90.
25. Xie, G., Keyhani, N. O., Bonner, C. A. & Jensen, R. A. (2003). Ancient origin of the tryptophan operon and the dynamics of evolutionary change. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 303-42, table of contents.
26. Alifano, P., Fani, R., Lio, P., Lazcano, A., Bazzicalupo, M., Carlomagno, M. S. & Bruni, C. B. (1996). Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol Rev* **60**, 44-69.
27. Merino, E., Jensen, R. A. & Yanofsky, C. (2008). Evolution of bacterial trp operons and their regulation. *Curr Opin Microbiol*.
28. Carlomagno, M. S., Chiariotti, L., Alifano, P., Nappo, A. G. & Bruni, C. B. (1988). Structure and function of the Salmonella typhimurium and Escherichia coli K-12 histidine operons. *J Mol Biol* **203**, 585-606.

29. Kieser, T. (2000). *Practical streptomyces genetics*, John Innes Foundation, Norwich, UK.
30. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. & Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-7.
31. Chater, K. F. (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 761-8.
32. Hu, D. S., Hood, D. W., Heidstra, R. & Hodgson, D. A. (1999). The expression of the *trpD*, *trpC* and *trpBA* genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is regulated by growth rate and growth phase but not by feedback repression. *Mol Microbiol* **32**, 869-80.
33. Hodgson, D. A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol* **42**, 47-238.
34. Parish, T. (2003). Starvation survival response of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **185**, 6702-6.
35. 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, R. E., Priddle, J. D. & Waley, S. G. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**, 609-14.
36. Sterner, R. & Hocker, B. (2005). Catalytic versatility, stability, and evolution of the (betaalpha)8-barrel enzyme fold. *Chem Rev* **105**, 4038-55.
37. Orengo, C. A. & Thornton, J. M. (2005). Protein families and their evolution—a structural perspective. *Annu Rev Biochem* **74**, 867-900.
38. Nagano, N., Orengo, C. A. & Thornton, J. M. (2002). One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. *J Mol Biol* **321**, 741-65.
39. Wierenga, R. K. (2001). The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett* **492**, 193-8.
40. Larsen, T. M., Laughlin, L. T., Holden, H. M., Rayment, I. & Reed, G. H. (1994). Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn²⁺, K⁺, and pyruvate. *Biochemistry* **33**, 6301-9.
41. Song, L., Kalyanaraman, C., Fedorov, A. A., Fedorov, E. V., Glasner, M. E., Brown, S., Imker, H. J., Babbitt, P. C., Almo, S. C., Jacobson, M. P. & Gerlt, J. A. (2007).

Prediction and assignment of function for a divergent N-succinyl amino acid racemase. *Nat Chem Biol* **3**, 486-91.

42. Hocker, B., Jurgens, C., Wilmanns, M. & Sterner, R. (2001). Stability, catalytic versatility and evolution of the (beta alpha)(8)-barrel fold. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 376-81.
43. Hennig, M., Jansonius, J. N., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Dijkstra, B. W. & Schlesier, B. (1995). Crystal structure of concanavalin B at 1.65 Å resolution. An "inactivated" chitinase from seeds of *Canavalia ensiformis*. *J Mol Biol* **254**, 237-46.
44. Hennig, M., Pfeffer-Hennig, S., Dauter, Z., Wilson, K. S., Schlesier, B. & Nong, V. H. (1995). Crystal structure of narbonin at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **51**, 177-89.
45. Wada, M., Hsu, C. C., Franke, D., Mitchell, M., Heine, A., Wilson, I. & Wong, C. H. (2003). Directed evolution of N-acetylneuraminic acid aldolase to catalyze enantiomeric aldol reactions. *Bioorg Med Chem* **11**, 2091-8.
46. Hsu, C. C., Hong, Z., Wada, M., Franke, D. & Wong, C. H. (2005). Directed evolution of D-sialic acid aldolase to L-3-deoxy-manno-2-octulosonic acid (L-KDO) aldolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9122-6.
47. Barona-Gomez, F. & Hodgson, D. A. (2003). Occurrence of a putative ancient-like isomerase involved in histidine and tryptophan biosynthesis. *EMBO Rep* **4**, 296-300.
48. Leopoldseder, S., Claren, J., Jurgens, C. & Sterner, R. (2004). Interconverting the catalytic activities of (betaalpha)(8)-barrel enzymes from different metabolic pathways: sequence requirements and molecular analysis. *J Mol Biol* **337**, 871-9.
49. Kuper, J., Doenges, C. & Wilmanns, M. (2005). Two-fold repeated (betaalpha)₄ half-barrels may provide a molecular tool for dual substrate specificity. *EMBO Rep* **6**, 134-9.
50. Wright, H., Noda-Garcia, L., Ochoa-Leyva, A., Hodgson, D. A., Fulop, V. & Barona-Gomez, F. (2008). The structure/function relationship of a dual-substrate (betaalpha)₈-isomerase. *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 16-21.
51. Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., Sterner, R. & Wilmanns, M. (2000). Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion. *Science* **289**, 1546-50.
52. Saab-Rincon, G., Mancera, E., Montero-Moran, G., Sanchez, F. & Soberon, X. (2005). Generation of variability by in vivo recombination of halves of a (beta/alpha)₈ barrel protein. *Biomol Eng* **22**, 113-20.
53. Xie, G., Bonner, C. A., Song, J., Keyhani, N. O. & Jensen, R. A. (2004). Intergenomic displacement via lateral gene transfer of bacterial trp operons in an overall context of vertical genealogy. *BMC Biol* **2**, 15.

54. Matney, T. S., Goldschmidt, E. P., Erwin, N. S. & Scroggs, R. A. (1964). A preliminary map of genomic sites for F-attachment in *Escherichia coli* K12. *Biochem Biophys Res Commun* **17**, 278-81.
55. Holton, S. J., Weiss, M. S., Tucker, P. A. & Wilmanns, M. (2007). Structure-based approaches to drug discovery against tuberculosis. *Curr Protein Pept Sci* **8**, 365-75.
56. Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792-7.
57. Abascal, F., Zardoya, R. & Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**, 2104-5.
58. Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696-704.
59. Suyama, M., Torrents, D. & Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res* **34**, W609-12.
60. Yang, Z. (1994). Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J Mol Evol* **39**, 306-14.
61. Yang, Z. (1997). PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* **13**, 555-6.
62. Yang, Z., Wong, W. S. & Nielsen, R. (2005). Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Mol Biol Evol* **22**, 1107-18.
63. Thomsen, R. & Christensen, M. H. (2006). MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* **49**, 3315-21.
64. Schuttelkopf, A. W. & van Aalten, D. M. (2004). PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 1355-63.
65. Chaudhuri, B. N., Lange, S. C., Myers, R. S., Chittur, S. V., Davisson, V. J. & Smith, J. L. (2001). Crystal structure of imidazole glycerol phosphate synthase: A tunnel through a (beta/alpha)(8) barrel joins two active sites. *Structure* **9**, 987-997.
66. Kammann, M., Laufs, J., Schell, J. & Gronenborn, B. (1989). Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Res* **17**, 5404.
67. Cornvik, T., Dahlroth, S. L., Magnusdottir, A., Herman, M. D., Knaust, R., Ekberg, M. & Nordlund, P. (2005). Colony filtration blot: a new screening method for soluble protein expression in *Escherichia coli*. *Nat Methods* **2**, 507-9.
68. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-

- 12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**, 2006 0008.
69. Wright, H., Barona-Gomez, F., Hodgson, D. A. & Fulop, V. (2004). Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of phosphoribosyl isomerase (PriA) from *Streptomyces coelicolor*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 534-6.
 70. Kirschner, K., Szadkowski, H., Jardetzky, T. S. & Hager, V. (1987). Phosphoribosylanthranilate isomerase-indoleglycerol-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **142**, 386-97.
 71. Creighton, T. E. (1968). The nonenzymatic preparation in solution of N-(5'-phosphoribosyl) anthranilic acid, an intermediate in tryptophan biosynthesis. *J Biol Chem* **243**, 5605-9.
 72. Miroux, B. & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**, 289-98.
 73. Leslie, A. G. W. (1992). Jnt CCP4/ESF/EACMB. *Newsl. Protein Crystallogr* **26**, 27-33.
 74. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-3.
 75. Read, R. J. (2001). Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 1373-82.
 76. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-55.
 77. Park, H. S., Nam, S. H., Lee, J. K., Yoon, C. N., Mannervik, B., Benkovic, S. J. & Kim, H. S. (2006). Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold. *Science* **311**, 535-8.
 78. Whitlock, M. C., Phillips, P. C., Moore, F. B. G. & Tonsor, S. J. (1995). Multiple Fitness Peaks and Epistasis. *Annual Review of Ecology and Systematics* **26**, 601-629.
 79. Steipe, B., Schiller, B., Pluckthun, A. & Steinbacher, S. (1994). Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain. *J Mol Biol* **240**, 188-92.
 80. Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S. F. & Wyss, M. (2000). The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim Biophys Acta* **1543**, 408-415.
 81. Bershtein, S., Goldin, K. & Tawfik, D. S. (2008). Intense neutral drifts yield robust and evolvable consensus proteins. *J Mol Biol* **379**, 1029-44.

82. Maguid, S., Fernandez-Alberti, S., Parisi, G. & Echave, J. (2006). Evolutionary conservation of protein backbone flexibility. *J Mol Evol* **63**, 448-57.
83. Thanki, N., Zeelen, J. P., Mathieu, M., Jaenicke, R., Abagyan, R. A., Wierenga, R. K. & Schliebs, W. (1997). Protein engineering with monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM): the modelling and structure verification of a seven-residue loop. *Protein Eng* **10**, 159-67.

11. Anexos

11.1 Preparación de Soluciones y Medios de Cultivo

a) Medio Luria Bertrani (1L)

- 10 g triptona
- 10 g NaCl
- 5 g Extracto de levadura

Completar con agua miliQ a 1L

Para medio sólido:

- 15 g de bacto agar

b) Medio Mínimo M9 (1L)

- 10 mL glucosa 20%
- 100 mL sales M9 10x
- 1 mL Vitamina B1 1% p/v
- 1 mL MgSO₄ 7H₂O 1M
- 2 mL CaCl₂ 50 mM

Para medio sólido:

- 15 g bacto agar

c) Buffer *Pfu* (10X)

- 200mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C)
- 100mM (NH₄)₂SO₄
- 100mM KCl
- 1% (v/v) TritonX-100
- 1mg/ml BSA
- 20mM MgSO₄

11.2 Condiciones de PCR para construir las mutantes de PriA

a) Amplificación de los extremos 3' o 5' con los oligos mutagénicos

1µL pGEX_PriA (templado)

1µL Oligo mutagénico (For o Rev)

1µL Oligo pGEX_seq (For o Rev)

5µL dNTPs solución 10X

5µL Buffer solución 10X

3µL Pfu polimerasa

34µL Agua

Todos los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración de 20pM. Las concentraciones del buffer de reacción para la enzima *Pfu* se muestra en el anexo 1. Los productos fueron amplificados siguiendo el siguiente programa de PCR:

Ciclo 1 (1 vez)	95°C 5 min
Ciclo 2 (25 veces)	95°C 40 s
	65°C 40 s
	72°C 40 s
Ciclo 3 (1 vez)	72°C 7 min

b) Amplificación de los genes de *priA* mutados.

500 pg fragmento 3' de *priA*

500 pg fragmento 5' de *priA*

1µL Oligo pGEX_Seqfor

1µL Oligo pGEX_Seqrev

5µL dNTPs solución 10X

5µL Buffer solución 10X

3µL de Pfu

Agregar agua bidestilada hasta completar los 50µL.

En un primer paso se llevó a cabo el siguiente protocolo de PCR sin agregar los oligos pGEX-seq.

Ciclo 1 (1 vez)	95°C 5 min
Ciclo 2 (10 veces)	95°C 1 min
	65°C 1 min
	72°C 1 min
Ciclo 3 (1 vez)	72°C 7 min

Una vez terminado, se agregaron los oligos pGEX_seq y se repitió el mismo protocolo de PCR, repitiendo ahora 20 veces el ciclo 2.

11.3 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los actinomicetos seleccionados.



```

      100      110      120      130      140      150      160      170      180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Rxil  RPVQLAIIREIARAAG--VPLQVGGGIRTLEDVRAARRAGAARVVVGTAAVDRDFRLRALEELGADLVVAIAR--EG---VWATHGWSQ
Aodo  RGENSEIILARVIREVF--VRVEISGGITSPAAVEAGLAMPGERVNIATQALDDIDAVCEAVDTFGERVAVCDIVR---G---DRIIARRGGS
Tfus  RGHNREIILASIVGKLD--IKVEISGGIRDDESLNAALATGCHRNVNIGTAALENPDWCAKVIAEHGDRVAIGSDIVR---G---TIIAARGWT
JspH  RGDNAEIIAQIVGQLD--IDVEMSGGIRDAETLERALATGCRRVNLGTAALENPEWTASAI AEHGDRIAVGSDIVR---G---TIIAARGWT
NspJ  RGSNREIILAEIVGALD--VQVEMSGGIRDDESLAAALATGCRRVNLGTAALECPQEWCRRVIAEHGDRVAIGSDIVR---G---RTIIAARGWT
Save  TGDNRALIAEVAGAMD--IKVEISGGIRDDDTLAAALATGCTRVNLGTAALETPEWVAKVIAEHGDKIAVGSIVR---G---TIIIRGRGWT
Scoe  TGDNRALIAEVAQAMD--IKVEISGGIRDDDTLAAALATGCTRVNLGTAALETPEWVAKVIAEHGDKIAVGSIVR---G---TIIIRGRGWT
Ssca  TGDNRDIIVAGVTRAMD--IKVEISGGIRDDASLAKALATGCTRVNLGTAALETPEWVAKVIAEHGDRIVAGSDIVR---G---TIIKIRGRWT
Faln  RGSNREIILAEVVRSD--VAVEISGGIRDDDSLDAALATGAARVNLGTAALEDPDWVRRRIDRVGDRIAVGSDIVR---G---TIIAARGWT
FspC  RGSNREIILAEVVRVD--VAVEISGGIRDDASLDAALATGAARVNLGTAALEDPDWVRRRIDRVGDRIAVGSDIVR---G---TIIISARGWT
FspE  RGSNRDIILAEVVRSD--VAVEISGGIRDDDSLDAALATGAARVNLGTAALEDPDWVRRKAIDRVGDRIAVGSDIVR---G---TIIAARGWT
Krad  RGSNREIILAEVVRGLD--VAVEISGGIRDDASLEAALATGCRRVNLGTAALEDPDWTRSAIARHGDRIVAGSDIVR---G---TIIAARGWT
AceI  RGSNREIILAEIVARVD--VAVEISGGIRDDESLRVALATGCARVNLGTAALENPEWVRRVVAEYGEKIAVGSIVR---DG---RIIARRGWT
CdiP  RGSNHEIILAEVVKNLD--INVEITGGIRDDASLKRALATGARRVNLGTAALEKPEWIEKVLGEYGDIAVDSIVRNIDG-QWFIIRGNVWV
Cglu  RGSNHEIILAEIVGKLD--VDVEITGGIRDDESLERALATGARRVNLGTAALEKPEWIASAIQRYGEKIAVDSIVRLEDG-EWFIIRGNVWV
Cjei  RGSNFEIILAEVVTGQLD--VNVEISGGIRDDESLERALSTGCRRVNLGTAALEDPQWCESVISRYGDKVAIGSDITREVDG-EWFIIRGRGWT
Cure  RGSNFEIILAEVVTQAMD--LKVEISGGIRDDASLERALSTGCERVNLGTAALENPEWCKKIQEYHGDKVAIGSDITREVDG-EWFIIRGRGWT
Sery  RGSNREIILADVAKLD--VRVEISGGIRDDASLEAALATGCERVNLGTAALENPEWADRVAEYGDRIAVGSDIVRITEQ-GHRIIARRGWT
Sare  RGSNADIIADVVQRDL--VRVEISGGVRDDESLRAALATGATRVNLGTAALEDPWLCDRVCGEYGDRIAVGSDIVR---GRTIISARGWT
Stro  RGSNAEIIADVVRRLD--VRVEISGGIRDDASLQAALATGAARVNLGTAALEDPQWCDRVCGEYGDRIAVGSDIVR---GQTIISARGWT
Requ  RGSNREIILAAVVGELD--VKVEISGGIRDDASLEAALATGCARVNLGTAALENPEWCARAIKHEGRIAVGSDIVKIDG-DCRIIRGRGWT
RspR  RGSNREIILADVVGELD--VQVEISGGIRDDASLEAALATGCGRVNLGTAALENPEWCARAIKHEGRIAVGSDIVRLVDG-EYQIRGRGWT
Nfar  RGSNREIILAKVVGELD--VKVEISGGIRDDASLEAALATGCARVNLGTAALEDPQWCARAIKHEGRIAVGSDIVRIIDG-DYRIIRGRGWT
Msme  RGSNREIILAEVVGKLD--VAVEISGGIRDDESLRAALDTCARVNLGTAALENPEWCARAI AEHGDRIAVGSDIADQTDGAGGFRIIRGRGWE
Mlep  RGSNREIILAEVVGKLD--VQVEISGGIRDDDSLNAALATGCARVNLGTAALENPEHWCAQVIAEHGDKIAVGSIVQIVDG-QHRIIRGRGWE
MspJ  RGSNREIILADVVRGLD--VAVEISGGIRDDESLAALATGCARVNLGTAALENPEWCQAKVVAEFGDKVAVGSDIVKIVDD-QHRIIRGRGWE
MspK  RGSNREIILADVVRGLD--VAVEISGGIRDDESLAALATGCARVNLGTAALENPEWCQAKVVAEFGDKVAVGSDIVKIVDD-QHRIIRGRGWE
Mvan  RGSNREIILAEVVGKLD--VAVEISGGIRDDDSLAAALATGCARVNLGTAALENPEWCQAKVVAEFGDKVAVGSDIVKIVDD-QHRIIRGRGWE
MtuH  RGSNHEIILAEVVGKLD--VQVEISGGIRDDESLAAALATGCARVNLGTAALENPEWCARVIGEHGDQVAVGSDIVQIIDG-EHRIIRGRGWE
Mbov  RGSNHEIILAEVVGKLD--VQVEISGGIRDDESLAAALATGCARVNLGTAALENPEWCARVIGEHGDQVAVGSDIVQIIDG-EHRIIRGRGWE
Mmar  RGSNREIILAEVVGKLD--VAVEISGGIRDDDSLAAALATGCARVNLGTAALENPEWCARMIAEHGKVAVGSIVQIVDG-KHRIIRGRGWE
Mulc  RGSNREIILAEVVGKLD--VAVEISGGIRDDDSLAAALATGCARVNLGTAALENPEWCARMIAEHGKVAVGSIVQIVDG-KHRIIRGRGWE
Anae  RGSNHEIILAEIVGVEG--IKVEISGGIRDDASLARALSAGAARVNLGTAALEDPQWTERVIAEHGDKIAVGSIVR---G---SIIAARGWT
Bado  TGNNRDQIRAEIVKELGDKVNIEMSGGVRDDASLDAALEAGAARVNLGTAALENPDWTASVIKKGDRVAVGSDIVR---G---HTIARRGWT
Blon  TGNNRDQIREIVHELGDVRNIEISGGVRDDASLDAALEAGAARVNLGTAALENPDWTASVIKKGDRVAVGSDIVR---G---HTIARRGWT
Blin  RGSNSDIIINQVVKAVG--IKVEISGGIRDDESLERALDTGAERVNLGTAALENPEWTADMISRFGDQVAIGSDIVR---G---TIIAARGWT
Cmic  RGDNLVSIIRVIRIDG-VQIEISGGIRDDSLDVALESGATRINLGTAALENPEWAASVIAQHGEAVAVGSDIVR---G---RTIISARGWT
Lxyl  RGDNRGIIKRVIRQTKG-VKIEISGGIRDDDSLHALEIGATRNLGTAALENPEWASHVIGQYGEAIAVGSIVR---G---TIIAARGWT
AspF  RGSNAEIIAEVVRGLD--IKVEISGGIRDDESLKALDLGVARVNLGTAALENPEWTARAI DRFGDKIAVGSIVR---G---TIIARRGWT
Aaur  RGNNAAIISDVVSQNLN--VKVEISGGIRDDESLERALELGVARVNLGTAALENPEWTRKAI DRFGDKIAVGSIVR---G---TIIARRGWT

```

```

      190      200      210      220      230      240      250      260      270
Rxil  RQSGVGAELAGELAAEGVRAVLFVDISRDTGEGGAALERTAEVAG--IIPTIASGGVRCAGDIRALARTP--GVVGAVVGTALYEGQAT
Aodo  GEGGN-VWEALRVLDEAGVARLVVTDVTRDGMNGSNRELLARVADQTPACIIASGGVNSLADIEALRALG---IEGAIIVGKALYQGAF
Tfus  RDGGD-LYETLERLEAAGCARYIVTDVVKDGTGKGNLDRDVCRTDRPIIASGGVSTLADIEALRTMVGEGVEGAIMGTALYEGAF
JspH  QEGGD-LWETLERLDAEGCARYVVDVVKDGMKGNLDRDVCRTDRPIIASGGVSTLADIEALRTMVGEGVEGAIMGTALYEGAF
NspJ  KDGGD-LYETLARLDAEGCARYVVDVVKDGMKGNLQLLRDVCAATSAPVVASGGVSTLADIEALMELVPGVEGAIAGTALYEGRFT
Save  RDGGD-LYETLERLNSEGCARYVVDIAKDGTLQGNLELLRNVCATDRPVVASGGVSSLDLRAIAALVPLGVEGSIIVGKALYAKAF
Scoe  RDGGD-LYETLDRLNKEGCARYVVDIAKDGTLQGNLELLKNVCAATDRPVVASGGVSSLDLRAIAGLVPAGVEGAIIVGKALYAKAF
Ssca  RDGGD-LYETLERLDKEGCARYVVDIAKDGTLQGNLELLKNVCAATDRPVVASGGVSSLDLRAIAELVPLGVEGAIIVGKALYAKAF
Faln  QDGGE-LFEVLARLADAGCARYVVDVRRDGTGTLGNVELLRVSVTAVTDRPVVASGGVSSALADLVAIAAVP--GVEGAIIVGKALYAGAF
FspC  RDGGE-LFDVLARLADAGCARYVVDVRRDGTGTLGNVELLRVSVTAVTDRPVVASGGVSSALADLVAIAAVP--GVEGAIIVGKALYAGAF
FspE  REGGE-LYEVLARLADAGCARYVVDVRRDGTGTLGNVELLRVAVTAAATRPVVASGGVSSLEDLRIAIVP--GVEGAIIVGKALYAGAF
Krad  REGGD-LWEVLARLADAGCARYVVDVTKDGTGTLGNVELLRVAVTAAATRPVVASGGVSSLEDLRIAIVP--GVEGAIIVGKALYAGAF
Acel  KDGGE-LFEVLARLADAGCARYVVDVARDGTGTLGNVELLRVAVTAAATRPVVASGGVSSLEDLRIAIVP--GVEGAIIVGKALYAGAF
Ccip  SDGGD-LWEVLERLDSQGCARFVVDVSKDGTGTLGNVELLRVAVTAAATRPVVASGGVSSLEDLRIAIVP--GVEGAIIVGKALYAGAF
Cglu  SDGGD-LWEVLERLDSQGCARFVVDVSKDGTGTLGNVELLRVAVTAAATRPVVASGGVSSLEDLRIAIVP--GVEGAIIVGKALYAGAF
Cjei  SDGGE-LWEVLERLDSQGVSRVVDVSRDGMNGNPNIDLLREVAATDAPVVASGGVSSLDLRAIAAVVHEGVDSAIVGKALYAGKFT
Cure  SDGGN-LWEVLERLDAEGVSRVVDVSRDGMNGNPNVELLRVAVTAAATRPVVASGGVSSLDLRAIAAVVDEGVDSAIVGKALYAGKFT
Sery  TDGGD-LWEVLARLDAAGCRRVVDVSKDGTGTLGNVALLEVVCRTDAPVIASGGVSSVDDLVELSRLAGDGLGSIIVGKALYAGNFT
Sare  RDGGD-LWEVLARLDRAGASRYVVDITKDGTMRGPNLELLREVAATDAPVVASGGVSSLDLRAIAALEPAGVEGVIAGKALYAGAF
Stro  KDGGD-LWEVLARLDRAGASRYVVDITKDGTMRGPNLELLREVAATDAPVVASGGVSSLDLRAIAALEPAGVEGVIAGKALYAGAF
Requ  SDGGD-LWEVLERLNRDGCRRVVDVSKDGTGTLGNLELLSVAACATDAPVVASGGVSTIADLEAIAAGLVGEGVEGSIIVGKALYAGRFT
RspR  TEGGN-LWETLARLDKGCRRVVDVSKDGTGTLGNLELLAQVCAATDAPVVASGGVSTIADLRAIAGLVDQGGVEGSIIVGKALYAGRFT
Nfar  SDGGD-LWEVLERLDRDGCRRVVDVTKDGTGTLGNLELLSEVCAATEAPVIASGGVSAIEDLVAIAGLVPVEGVEGAIIVGKALYAGRFT
Msme  TDGGD-LWEVLDRLDSEGCRRVVDVSKDGTGTLGNLDDLAAGVADRTDAPVIASGGVSSLDLRAIATLTGVEGAIIVGKALYAGRFT
Mlep  TDGGD-LWDVLENLDRQGCRRFVVDVTKDGTGTLGNLDDLASVSDRTNVPVIASGGVSSLDLRAIAKFTERGIEGAIIVGKALYAEFT
MspJ  TDGGD-LWEVLDRLDSEGCRRVVDVTKDGTGTLGNLDDLRVADRTDAPVIASGGVSSLDLRAIATLTDRGVEGAIIVGKALYAGRFT
MspK  TDGGD-LWEVLDRLDSEGCRRVVDVTKDGTGTLGNLDDLRVADRTDAPVIASGGVSSLDLRAIATLTDRGVEGAIIVGKALYAGRFT
Mvan  TDGGD-LWTVLDRLDSEGCRRFVVDVTKDGTGTLGNLLELLTQVCERTDAPVIASGGVSSLDLRAIATLTDRGVEGAIIVGKALYAGRFT
MtuH  TDGGD-LWDVLERLDSSEGCRRFVVDITKDGTLGGPNLDDLAGVADRTDAPVIASGGVSSLDLRAIATLTHRGVEGAIIVGKALYARRFT
Mbov  TDGGD-LWDVLERLDSSEGCRRFVVDITKDGTLGGPNLDDLAGVADRTDAPVIASGGVSSLDLRAIATLTHRGVEGAIIVGKALYARRFT
Mmar  TDGGD-LWEVLQRLDSEGCRRVVDVTKDGTLAGPNLELLAGVAGRTDAPVIASGGVSSLDLRAIATLTGQGGVEGAIIVGKALYAGRFT
Mulc  TDGGD-LWEVLQRLDSEGCRRVVDVTKDGTLAGPNLELLAGVAGRTDAPVIASGGVSSLDLRAIATLTGQGGVEGAIIVGKALYAGRFT
Anae  KEGGD-LWESLERLNAAGCARYVVDVTRDGTGTLGNPTALLTEVCAAPVVASGGVSSLDLRAIATLTGQGGVEGAIIVGKALYAGNFT
Bado  KEGGD-LFETMKFLDSVGCRRVVDVARDGMMSPNIELLEVAERTDAKVTASGGVSSLDLRLNIKELAEELGVDAILGKSLYARAF
Blon  REGGD-LFETMKFLDSVGCRRVVDVAKDGMSPNIQLLEVAERTDAKVTASGGVSSLDLRAIKELAEIGVDSAILGKSLYARAF
Blin  KDGGD-LYEVLSTLEKAGCARYVVDVVRKGTGTLQGNVELLKSMAEKTKPIVASGGVSSLDLRLRELVPYGVDSAIIVGKALYAGKFT
Cmic  QDGGD-IWEVLERLEDAAGCARYVVDVTKDGTGTLQGNLQLLRDVLETERPVVASGGVSSLDLQALRELVPYGVDSAIIVGKALYAGAF
Lxyl  REGGD-LWQVLERLEEAAGCARYVVDVTKDGALKGNLDRDQVTERPVVASGGVSSLDLQALRELVSLGVEGAIIVGKALYAGAF
AspF  KEGGD-LWDVLARLEEAAGCARYVVDVTKDGTGTLQGNVELLRKQVTERPVVASGGVSSLEDLKVLRSLVPLGVEGAIIVGKALYAGAF
Aaur  KEGGD-LWEVLARLEDAAGCARYVVDVTKDGTGTLQGNVELLRQVMEKTKPIVASGGVSSLEDLRLRELVPYGVDSAIIVGKALYAGAF

```

11.4 Actinomicetos utilizados para la caracterización filogenética de PriA
y las claves utilizadas para representarlos en los filogramas.

Nombre microorganismo	Base de datos	Clave
<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	NCBI	Acel
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	NCBI	Aodo
<i>Arthrobacter aurecens</i> TC1	NCBI	Aaur
<i>Arthrobacter</i> sp. FB24	NCBI	AspF
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	NCBI	Bado
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	NCBI	Blon
<i>Brevibacterium linens</i> BL2	DOE Joint	Blin
<i>Clavibacter michiganensis</i>	Sanger Inst.	Cmic
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC 13129	NCBI	Cdip
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	NCBI	Cglu
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	NCBI	Cure
<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	NCBI	Cjei
<i>Francia alni</i> ACN14A	NCBI	Faln
<i>Francia</i> sp. CcI3	NCBI	FspC
<i>Francia</i> sp. EAN1pec	NCBI	FspE
<i>Janibacter</i> sp. HTCC2649	IMG	JspH
<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	NCBI	Krad
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> str. CTCB07	NCBI	Lxyl
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10	NCBI	Mavp
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Pasteur	NCBI	Mbov
<i>Mycobacterium leprae</i> TN	NCBI	Mlep
<i>Mycobacterium marinum</i>	NCBI	Mmar
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2	NCBI	Msme
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	NCBI	MtuH
<i>Mycobacterium ulcerans</i> Agy99	NCBI	Mulc
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	NCBI	Mvan
<i>Mycobacterium</i> sp. KMS	NCBI	MspK
<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	NCBI	MspJ
<i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152	NCBI	Nfar
<i>Nocardioides</i> sp. JS614	NCBI	NspJ
<i>Rhodococcus equi</i>	Sanger Inst.	Requ
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	NCBI	RspR
<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	NCBI	Rxil
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Biotica Tech.	Sery
<i>Salinispora arenicola</i> CNS-205	NCBI	Sare
<i>Salinispora tropica</i> CNB-440	NCBI	Stro
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	NCBI	Sve
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	NCBI	Scoe
<i>Streptomyces scabies</i>	Sanger Inst.	Ssca
<i>Thermobifida fusca</i> YX	NCBI	Tfus

11.5 Resultados de ProTest

ProtTest - 1.4 Selection of models of protein evolution
(c) 200 Federico Abascal, Rafael Zardoya, David Posada
(FA, DP) Facultad de Biología, Universidad de Vigo, 36200
Vigo, Spain
(RZ) Museo Nacional de Ciencias Naturales, 28006
Madrid, Spain

Matrices: JTT, MtREV, MtMam, MtArt, Dayhoff, WAG, RtREV,
CpREV, Blosum62, VT, HIVb, HIVw.

Distribuciones: +I (invariable sites), +G (rate categories), +I+G.

Best model according to AIC: WAG+G+F

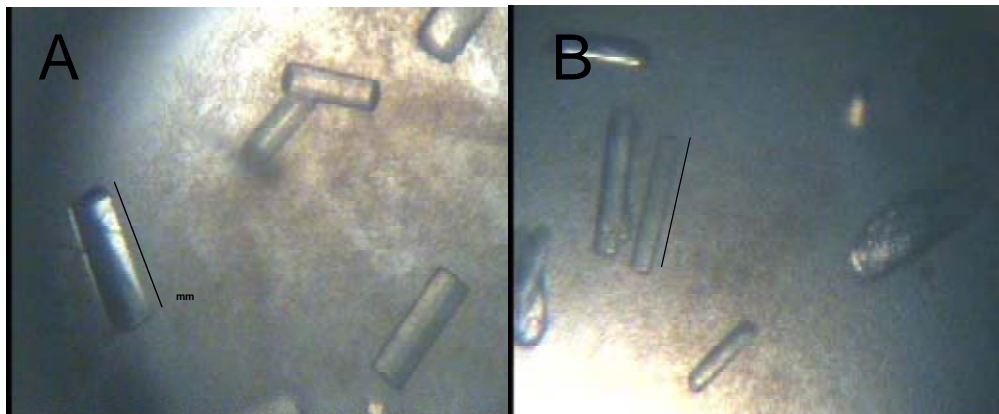
Model	deltaAIC*	AIC ^(a)	AICw	-lnL
WAG+G+F	0.00	16870.42	0.73	-8334.21
WAG+I+G+F	2.00	16872.43	0.27	-8334.21
RtREV+G+F	23.33	16893.75	0.00	-8345.88
WAG+G	23.54	16893.97	0.00	-8364.98
RtREV+I+G+F	25.34	16895.76	0.00	-8345.88
WAG+I+G	25.54	16895.97	0.00	-8364.98
CpREV+G+F	117.94	16988.36	0.00	-8393.18
CpREV+I+G+F	119.94	16990.37	0.00	-8393.18
Blosum62+G+F	149.41	17019.83	0.00	-8408.92
Blosum62+I+G+F	155.27	17025.69	0.00	-8410.84
JTT+G	166.67	17037.09	0.00	-8436.55
JTT+I+G	168.67	17039.09	0.00	-8436.55
VT+G	178.47	17048.90	0.00	-8442.45
VT+I+G	180.48	17050.91	0.00	-8442.45
JTT+G+F	226.93	17097.35	0.00	-8447.68
JTT+I+G+F	228.93	17099.36	0.00	-8447.68
Blosum62+G	230.87	17101.29	0.00	-8468.65
Blosum62+I+G	232.88	17103.30	0.00	-8468.65
RtREV+G	256.93	17127.35	0.00	-8481.68
CpREV+G	258.08	17128.50	0.00	-8482.25
RtREV+I+G	258.62	17129.04	0.00	-8481.52

CpREV+I+G	260.09	17130.51	0.00	-8482.26
Dayhoff+G+F	276.92	17147.34	0.00	-8472.67
Dayhoff+I+G+F	289.36	17159.78	0.00	-8477.89
Dayhoff+G	310.57	17180.99	0.00	-8508.50
Dayhoff+I+G	311.80	17182.23	0.00	-8508.11
VT+G+F	357.46	17227.89	0.00	-8512.94
VT+I+G+F	359.47	17229.90	0.00	-8512.95
MtREV+G+F	502.62	17373.05	0.00	-8585.52
MtREV+I+G+F	511.33	17381.76	0.00	-8588.88
HIVb+G+F	562.83	17433.25	0.00	-8615.63
HIVb+G	563.22	17433.64	0.00	-8634.82
HIVb+I+G+F	564.83	17435.25	0.00	-8615.62
HIVb+I+G	565.13	17435.55	0.00	-8634.77
WAG+I+F	625.64	17496.07	0.00	-8647.03
WAG+I	644.78	17515.20	0.00	-8675.60
Blosum62+I+F	769.60	17640.02	0.00	-8719.01
RtREV+I+F	783.39	17653.82	0.00	-8725.91
CpREV+I+F	815.40	17685.82	0.00	-8741.91
JTT+I	859.53	17729.95	0.00	-8782.98
Blosum62+I	869.09	17739.51	0.00	-8787.76
WAG+F	913.91	17784.33	0.00	-8792.16
WAG	932.15	17802.58	0.00	-8820.29
JTT+I+F	934.93	17805.35	0.00	-8801.68
MtMam+I+G+F	942.98	17813.40	0.00	-8804.70
MtMam+G+F	945.24	17815.67	0.00	-8806.83
CpREV+I	967.07	17837.50	0.00	-8836.75
VT+I	976.20	17846.62	0.00	-8841.31
RtREV+I	999.89	17870.31	0.00	-8853.16
MtArt+G+F	1006.20	17876.62	0.00	-8837.31
MtArt+I+G+F	1008.88	17879.30	0.00	-8837.65
Dayhoff+I	1009.90	17880.32	0.00	-8858.16
Dayhoff+I+F	1046.91	17917.34	0.00	-8857.67
Blosum62+F	1048.00	17918.42	0.00	-8859.21
RtREV+F	1064.27	17934.70	0.00	-8867.35
CpREV+F	1080.78	17951.20	0.00	-8875.60
Blosum62	1147.35	18017.77	0.00	-8927.88
VT+I+F	1160.66	18031.08	0.00	-8914.54
HIVw+G+F	1193.35	18063.77	0.00	-8930.89
HIVw+I+G+F	1200.86	18071.28	0.00	-8933.64
JTT	1210.59	18081.01	0.00	-8959.51
CpREV	1234.48	18104.91	0.00	-8971.45

VT	1277.74	18148.17	0.00	-8993.08
RtREV	1277.78	18148.20	0.00	-8993.10
JTT+F	1297.70	18168.12	0.00	-8984.06
Dayhoff	1377.95	18248.38	0.00	-9043.19
Dayhoff+F	1414.41	18284.83	0.00	-9042.41
HIVb+I	1439.41	18309.84	0.00	-9072.92
HIVw+G	1440.88	18311.30	0.00	-9073.65
HIVw+I+G	1442.56	18312.98	0.00	-9073.49
VT+F	1470.42	18340.85	0.00	-9070.42
HIVb+I+F	1482.23	18352.66	0.00	-9075.33
MtREV+I+F	1544.27	18414.69	0.00	-9106.35
MtREV+I+G	1760.59	18631.02	0.00	-9232.51
MtREV+G	1761.53	18631.95	0.00	-9233.98
MtREV+F	1855.72	18726.14	0.00	-9263.07
HIVb	1855.95	18726.37	0.00	-9282.18
HIVb+F	1906.10	18776.52	0.00	-9288.26
HIVw+I+F	2120.17	18990.59	0.00	-9394.30
MtMam+G	2148.41	19018.83	0.00	-9427.42
MtMam+I+G	2150.37	19020.79	0.00	-9427.40
MtArt+G	2197.25	19067.67	0.00	-9451.84
MtArt+I+G	2200.94	19071.36	0.00	-9452.68
HIVw+I	2266.32	19136.75	0.00	-9486.37
MtMam+I+F	2519.66	19390.08	0.00	-9594.04
HIVw+F	2633.07	19503.50	0.00	-9651.75
MtArt+I+F	2686.28	19556.70	0.00	-9677.35
HIVw	2759.32	19629.74	0.00	-9733.87
MtMam+F	2893.90	19764.32	0.00	-9782.16
MtREV+I	3007.63	19878.05	0.00	-9857.02
MtArt+F	3064.81	19935.24	0.00	-9867.62
MtREV	3303.60	20174.02	0.00	-10006.01
MtMam+I	4173.07	21043.49	0.00	-10439.75
MtArt+I	4253.02	21123.45	0.00	-10479.72
MtMam	4550.18	21420.60	0.00	-10629.30
MtArt	4626.50	21496.93	0.00	-10667.46

(a) Relación entre el número de parámetros y el $-\ln$.

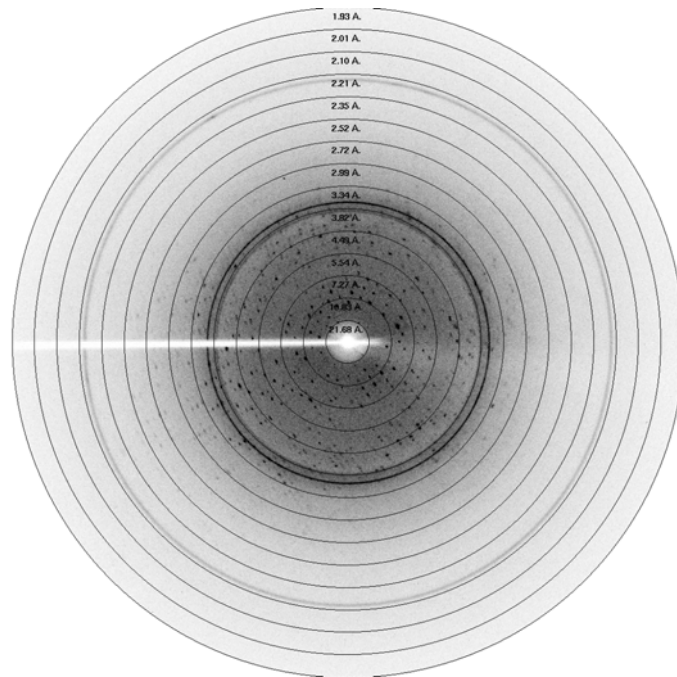
11.6 Cristales de las mutantes T29K (A) y R139N (B)



La linea corresponde a 2.5 mm.

11.7 Patrones de difracción en casa de los cristales de las diferentes mutantes de PriA

a) Patrón de difracción de T29K



b) Patrón de difracción de R139N

