



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATALISIS**

**MIGRACIÓN FUNCIONAL ENTRE DISTINTOS  
PLEGAMIENTOS CON MECANISMOS DE REACCIÓN  
COMUNES**

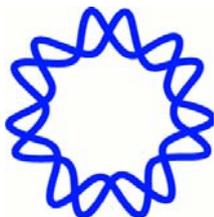
**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**IBQ. PABLO CRUZ MORALES**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO BARONA GÓMEZ**

**CUERNAVACA, MORELOS, FEBRERO DE 2009**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos:**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto de Biotecnología, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco.

Al Dr. Francisco Barona Gómez, por su apoyo, por la búsqueda incansable de recursos, retos académicos interesantes y oportunidades para nuestro grupo, por su confianza y amistad.

A Lianet Noda y Aldo Camacho, por las discusiones, su orientación y ayuda técnica, por transmitirme su entusiasmo, por su confianza y amistad.

Al grupo de evolución dirigida de proteínas del Instituto de Biotecnología, especialmente al Dr. Joel Osuna, Adrian Ochoa, Karina Verdel, y Filiberto Sánchez, por su ayuda técnica, discusiones y por su amistad.

Al grupo de diseño de proteínas del instituto Max Planck para la biología del desarrollo. Especialmente a Birte Höcker y Bettina Schreier, por su colaboración fundamental para el desarrollo de este proyecto, por su orientación y calidez al recibirme en su grupo.

Al grupo de Evolución de la diversidad metabólica del Laboratorio nacional de genómica para la biodiversidad.

A José Luis y Luciana por la beca infinita, por su amor y apoyo incondicional.

## Índice.

<b>1. Introducción: evolución de la función enzimática.....</b>	<b>6</b>
1.1. Modelos de evolución por duplicación génica .....	6
1.2. Evolución divergente de la función enzimática.....	7
1.2.1. Retención de la especificidad de sustrato .....	7
1.2.2. Retención del mecanismo de reacción.....	8
1.2.5. La subfamilia monofuncional de la enolasa glicolítica .....	13
1.3. Evolución convergente de la función enzimática .....	14
1.4. Potencial evolutivo de los barriles ( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub> . .....	15
1.5. Ingeniería de proteínas y diseño computacional de enzimas.....	15
1.6. Métodos de selección y tamizado.....	17
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>19</b>
2.1. Mecanismos de eliminación .....	19
2.2. Actividad de deshidratación de la enolasa.....	20
2.3. Actividad enzimática de la 3-dehidroquinato deshidratasa tipo II .....	22
2.4. Relaciones entre DHQasas y enolasas.....	24
2.4.1. Relaciones mecánicas .....	24
2.4.2. Relaciones estructurales y funcionales.....	24
2.5. Consideraciones teóricas sobre el modelo experimental Enolasa-DHQasa tipo II ...	26
2.5.1. La evolvabilidad en la ingeniería de proteínas .....	26
2.5.2. Relaciones de paralogía en la ingeniería de proteínas.....	28
2.6. Consideraciones metodológicas .....	28

<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>30</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>30</b>
4.1. Objetivo general .....	30
4.2. Objetivos específicos.....	30
<b>5. Materiales y métodos .....</b>	<b>31</b>
5.1. Métodos bioinformáticos.....	31
5.2. Métodos de biología molecular .....	33
5.2.1. Clonación.....	33
5.2.2. Construcción de bibliotecas mutagénicas.....	33
5.2.3. Mutación de <i>Sco3096</i> y <i>Sco7638</i> .....	34
5.3. Ensayos de complementación.....	35
5.4. Sistema de selección de variantes con actividad DHQasa .....	36
5.5. Expresión heteróloga y Ensayos de solubilidad .....	37
5.6. Solubilización y replegamiento de la proteína en las fracciones insolubles.....	37
5.7 Purificación de <i>Sco3096</i> .....	37
5.8. Ensayo enzimático .....	38
<b>6. Resultados y discusión .....</b>	<b>39</b>
6.1. Selección del templado.....	39
6.2. Caracterización funcional <i>in vivo</i> de enolasas de <i>S. coelicolor</i> .....	40
6.2.2. Mutación de <i>Sco3096</i> y <i>Sco7638</i> .....	41
6.3. Caracterización <i>in vitro</i> de Enolasas de <i>S. coelicolor</i> .....	43
6.3.1. Expresión y purificación de enolasas <i>Sco7638</i> y <i>Sco3096</i> . .....	43
6.3.2. Determinación enzimática de la actividad de <i>Sco3096</i> .....	44

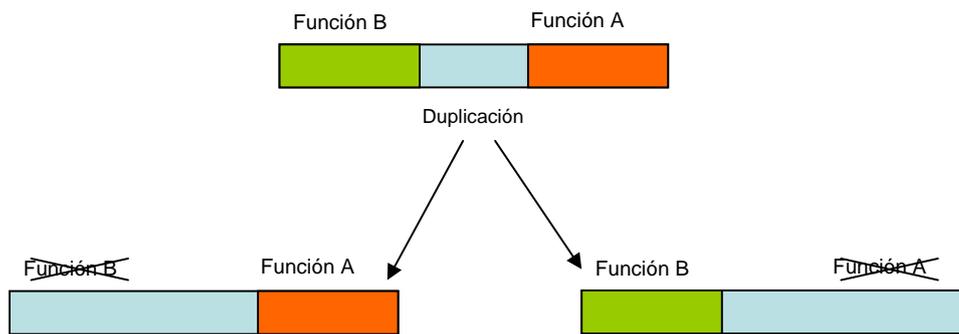
6.4. Rediseño del sitio activo de enolasa de levadura .....	45
6.5. Construcción de la librería mutagénica Aro-Eno .....	51
6.6. Selección de variantes con actividad DHQasa .....	53
<b>7. Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>55</b>
<b>8. Referencias .....</b>	<b>58</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>64</b>

# **1. Introducción: evolución de la función enzimática**

## **1.1. Modelos de evolución por duplicación génica**

Es probable que las células primitivas tuvieran un número reducido de genes, lo que únicamente se puede concebir en la medida en que sus enzimas fueran capaces de unirse a diversos sustratos (Jensen, 1976). Con el paso del tiempo, los cambios en el medio, condujeron a la adquisición de nuevas funciones y a la especialización de algunas de las enzimas ya existentes. La duplicación génica permitió aumentar el repertorio genético, y por lo tanto, el incremento en la complejidad metabólica que ahora observamos.

En 1973, Ohno propuso un modelo que sugiere que después de un evento de duplicación los genes pueden acumular mutaciones hasta dar lugar a una nueva función. El modelo sugiere que mientras que una de las copias mantiene la función original, la otra copia puede acumular mutaciones que pueden ser deletéreas o conducir a la adquisición de una nueva función, que en el caso de proveer de una ventaja adaptativa, sería seleccionada y fijada en la población. En este modelo, también conocido como neo-funcionalización (para una revisión reciente de estos conceptos evolutivos ver Des Marais y Rausher, 2008) se asume que los cambios conducen a la eliminación del duplicado y la fijación de un alelo que confiera ventajas adaptativas. Hughes (1994), propuso que la adquisición de una nueva función precede al evento de duplicación, el cual es seguido de un periodo de especialización, que daría lugar a dos nuevos genes (Figura 1). La identificación de la promiscuidad catalítica, y atributos mecánicos comunes, sugieren que los grupos de enzimas existentes evolucionaron siguiendo este mecanismo, al cual se le ha llamado sub-funcionalización o de escape de un conflicto adaptativo (Des Marais y Rausher, 2008).



**Figura 1. Representación del modelo de sub-funcionalización propuesto por Hughes (1994).** Un ancestro promiscuo da lugar a dos genes que sufren pérdida de la función complementaria y se especializan, de tal forma que “la función precede a la duplicación”.

## 1.2. Evolución divergente de la función enzimática

El número de plegamientos proteicos observados hasta la fecha es limitado. Es posible que los plegamientos proteicos existentes hayan surgido en más de un evento a lo largo de la historia, o que todas las proteínas actuales se hayan derivado de un reducido número de proteínas ancestrales. Es también posible que las observaciones actuales sean una combinación de ambos fenómenos (Gerlt *et al.*, 2001). Se ha observado que diversas funciones enzimáticas se encuentran en un mismo plegamiento, por lo que se han propuesto diversas hipótesis para explicar este fenómeno.

### 1.2.1. Retención de la especificidad de sustrato

Dado que cada vía de biosíntesis depende de la participación directa de un cierto número de genes, las reacciones enzimáticas codificadas por estos genes son de valor para el organismo solo cuando se consideran colectivamente en relación con el producto final. Debido a que la selección natural solo preserva caracteres que son seleccionables, resulta imposible que las vías biosintéticas evolucionen a través de la selección de una sola mutación a la vez. En respuesta a esta problemática, la hipótesis propuesta por Horowitz en 1945 establece que el orden en el que se añadieron nuevos pasos biosintéticos fue en el

sentido inverso, es decir, el último paso en la vía fue el primero en ser adquirido en el curso de la evolución. Una implicación de este modelo es que la enzima ancestral y la evolucionada deberían ser capaces de unirse al sustrato/producto, en otras palabras, retener la especificidad de sustrato, mientras que los mecanismos de reacción podrían ser distintos.

### **1.2.2. Retención del mecanismo de reacción**

Una alternativa a la hipótesis de Horowitz es que la naturaleza selecciona para evolucionar divergentemente a las enzimas que proveen características mecánicas favorables para la nueva función, por ejemplo, reacciones parciales, estrategias de estabilización, estados de transición o intermediarios (Gerlt *et al.*, 1998). Estas características son retenidas, mientras que la especificidad y algunas características mecánicas menores pueden ser alteradas, por ejemplo, durante el último paso de la reacción un grupo del sustrato puede ser eliminado, o bien este puede sufrir una isomerización. Aunque las enzimas pueden ser extraordinariamente específicas, las especificidades pueden ser más amplias de lo esperado (Jensen, 1976). La existencia de enzimas parálogas implica que las nuevas funciones pueden evolucionar a partir de enzimas preexistentes, las actividades promiscuas son posibles puntos de inicio para este proceso evolutivo. Este es el caso de la fosforibosilpirofosfato amidotransferasa (PurF), que complementa la deficiencia de Fosforibosil antranilato isomerasa (TrpF) en *E. coli*. La capacidad de PurF para catalizar la reacción de TrpF es debida aparentemente a su afinidad preexistente por sustratos fosforibosilados. (Patrick *et al.*, 2008) Esta observación demuestra que actividades secundarias débiles pueden incrementar la capacidad de sobrevivencia de un organismo en condiciones adversas.

Una implicación de este modelo es que el proceso evolutivo se encargaría de mejorar la eficiencia de la conversión conforme la nueva vía metabólica es optimizada. Se han descrito numerosos ejemplos de enzimas promiscuas que sustentan esta hipótesis (Patrick *et al.*, 2007). Las enzimas surgidas a través de este proceso evolutivo pertenecen a grupos conocidos como superfamilias mecanísticamente diversas, las cuales se abordarán más adelante. De hecho, ya que existe un número limitado de soluciones químicas para las reacciones que ocurren en la naturaleza, de igual modo que sucede con los plegamientos proteicos; se ha encontrado inclusive que enzimas que resultan distintas evolutivamente comparten mecanismos de reacción, intermediarios o estados de transición (Gherardini *et al.*, 2007).

### **1.2.3. Superfamilias de enzimas mecanísticamente diversas**

Los miembros de las superfamilias de enzimas mecanísticamente diversas, comparten atributos mecanísticos comunes, tales como intermediarios, estados de transición o rutas catalíticas y catalizan reacciones globales divergentes con diferentes especificidades de sustrato, (Anexos - Tabla A1). La existencia de superfamilias de enzimas mecanísticamente diversas permite imaginar que el proceso de formación de nuevas actividades catalíticas involucraría la incorporación de nuevos residuos en el sitio activo de una proteína preexistente, sin modificar los residuos catalíticos de la reacción parcial común (Gerlt *et al.*, 2001).

La existencia de firmas estructurales y funcionales conservadas entre los miembros de una misma superfamilia, permite identificar nuevos miembros de éstas; así como asignar funciones a proteínas que no han sido caracterizadas experimentalmente (Pegg *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007). La base de datos *Structure-Function Linkage Database* (SFLD) (Pegg *et al.*, 2006); almacena datos de 6 superfamilias, 113 subgrupos y 127 familias, incluyendo

información de las reacciones finales, secuencias, características estructurales y mecanismos conservados de las familias y superfamilias. Además, la SFLD incluye alineamientos de secuencia múltiples y modelos estructurales, lo que permite la identificación de firmas de secuencias. Sin embargo, a pesar de que hoy en día resulta claro que durante la evolución los mecanismos de reacción química se conservan, mientras que lo que cambia es la especificidad de sustrato, **se desconoce si esta fuerza evolutiva está restringida a un cierto plegamiento estructural puede manifestarse entre plegamientos distintos** (Glasner *et al.*, 2006a).

#### 1.2.4. Superfamilia de las enolasas

La superfamilia de las enolasas es una de las mejor caracterizadas en términos estructurales y mecanísticos. Se sabe que sus miembros catalizan al menos 14 diferentes reacciones incluyendo cicloisomerización, racemización y  $\beta$ -eliminación de agua o amoníaco. El sitio activo está localizado en la interfase formada entre asas (*loops*) flexibles del dominio N-terminal (*capping domain*) y la región C-terminal de un barril  $(\beta/\alpha)_8$  ó TIM. Los miembros de la superfamilia de las enolasas comparten una enolización asistida por  $Mg^{2+}$  de un carbono ácido, la cual da lugar a un intermediario que puede ser dirigido a diferentes productos por reacciones parciales diversas. La conservación de estas características sugiere la evolución divergente de los miembros de la superfamilia a partir de un ancestro común (Gerlt *et al.*, 2001).

Tres enzimas representativas de este grupo han sido ampliamente caracterizadas; la mandelato racemasa (MR) (EC 5.1.2.2), la muconato lactonizante (MLE) o muconato cicloisomerasa (EC 5.5.1.1) y la enolasa (EC 4.2.1.11). La MR cataliza la interconversión entre enantiómeros *R* y *S* de mandelato, La MLE cataliza la cicloisomerización reversible de *cis,cis*-muconato a muconolactona, mientras que las enolasas catalizan la  $\beta$ -eliminación

(tipo E1cB) de agua de 2-fosfoglicerato (2-PGA) para formar fosfoenolpiruvato (PEP). (Babbitt *et al.*, 1996) Recientemente, se han reconocido nuevos miembros de la superfamilia de las enolasas: manonato deshidratasa (ManD) que abstrae un protón al sustrato a través de una tirosina cuyo pKa es regulado por una arginina (Rakus *et al.*, 2007). Glucarato deshidratasa (GlucD) que abstrae un protón al sustrato empleando como base una histidina cuyo pKa es regulado por una arginina; (Gulick *et al.*, 2001) y metil aspartato amonio-liasa (MAL), que cataliza la *anti*-eliminación reversible de amoníaco del ácido L-treo-(2*S*,3*S*)-3-metil aspártico para formar ácido mesacónico en la vía catabólica del glutamato, empleando una lisina conservada como base (Levy *et al.*, 2002). La agrupación de los seis subgrupos que conforman la superfamilia de las Enolasas está basada en el uso común de metales ( $Mg^{2+}$ ) como cofactor y la catálisis ácido / base. Los residuos catalíticos característicos de cada familia se incluyen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Subgrupos y miembros pertenecientes a la superfamilia de las enolasas.** Se muestran los residuos con función de base, ácido o unión a magnesio según la numeración en la SFLD.

Subgrupo	Familia	Actividad	E.C.	Secuencias	Estructuras	Base	Ácido	Unión de Mg <sup>2+</sup>
Metil aspartato amonía liasa.	Metilaspártato amonía-liasa	Eliminación de amonio del ácido metilaspártico	4.3.1.2	8	4	Lys335		Asp24, Glu277, Asp311
	Enolasa	Deshidratación de 2-fosfoglicerato	4.2.1.11	378	27	Lys345	Glu279	Glu279, Asp343, Glu414
Glucarato deshidratasa	Glucarato deshidratasa	Deshidratación de D-glucarato	4.2.1.40	99	7	Lys253	His385	Asp281, Glu306, Asn335
	D-tartrato deshidratasa	Deshidratación de D-tartrato		15	3	Lys 183	His321	Asp212, Glu238, Glu264
	L-fuconato deshidratasa	Deshidratación de L-fuconato	4.2.1.68	35	4	Lys346	His407	Asp298, Glu324, Glu356
	L-talarato/ galactarato Deshidratasa	Deshidratación de L-talarato		10	4	Lys176	His307	Asp205, Glu231, Glu257
Mandelato racemasa	Galactonato deshidratasa	Deshidratación de D-galactonato	4.2.1.6	27		His287	His186	Asp184, Glu210, Glu237
	Gluconato deshidratasa	Deshidratación de gluconato	4.2.1.39	14		His300 Lys201	His200	Glu198, Glu224, Glu250
	Mandelato racemasa	Racemización de mandelato	5.1.2.2	3	6	His332	Glu352	Asp230, Glu256, Glu282
Manonato deshidrogenasa	Manonato deshidrogenasa	Deshidratación de manonato	4.2.1.8	67		Tyr176	His241	Asp239, Glu265, Glu291
	N-succinilaminoácido racemasa	Racemización N- succinilaminoácido		5	8	Lys172/ Lys272	Lys172/ Lys272	Asp198, Glu223, Asp248
	N-succinilaminoácido racemasa2	Racemización N-succinilaminoácido		12	3	Lys163/ Lys267	Lys163/ Lys267	Asp191, Glu218, Asp243
Muconato cicloisomerasa (antes MLE)	Cloromuconato cicloisomerasa	Cicloisomerización de cloromuconato	5.5.1.7	14	4	Lys169		Asp198, Glu224, Asp250
	Dipéptido epimerasa	Epimerización de dipeptidos		58	3	Lys160/ Lys272		Asp193, Glu221, Asp248
	Muconato cicloisomerasa	Cicloisomerización de muconato	5.5.1.1	27	5	Lys190		Asp219, Glu245, Asp270
	<i>o</i> -succinil benzoato sintasa	Deshidratación del ácido 2-succinil-6-hidroxi-2,4-ciclohexadieno-1-carboxílico		112	15	Lys575	Lys575	Asp620, Glu668, Asp702

### 1.2.5. La subfamilia monofuncional de la enolasa glicolítica

La familia de las enolasas es un grupo proteico altamente conservado, las identidades entre enolasas de diversos organismos es generalmente superior al 60%, esto contrasta con la alta divergencia observada entre miembros de otras familias (Glasner *et al.*, 2006b). La enolasa ocupa un subgrupo especial dentro de su superfamilia ya que no incluye otra actividad diferente a la deshidratación de 2-fosfoglicerato (2-PGA), sin promiscuidad catalítica conocida, lo cual contrasta dramáticamente con la promiscuidad catalítica reportada para otros miembros de la superfamilia. Sin embargo, es interesante destacar que esta enzima desempeña otras funciones biológicas independientes de su actividad catalítica. En *Escherichia coli* casi una décima parte de la enolasa es llevada a un complejo multienzimático denominado RNA degradosoma que destruye mRNA del transportador transmembranal de glucosa *ptsG* (Chandran & Luisi. 2006). Por otro lado, Entelis *et al.* (1996) demostraron que la enolasa en *Saccharomyces cerevisiae*, participa en el proceso de importación mitocondrial específico para tRK1 (tRNA<sub>Lys</sub><sup>CUU</sup>); en este organismo existen dos isoformas de enolasa, de las cuales Eno2 es significativamente más eficiente en esta tarea. Al introducir mutaciones que disminuyen la actividad catalítica de Eno2 hasta en un 22% (Asn207Ala), la función de transporte no se vio afectada, por lo que claramente estas funciones no están relacionadas. Con base en estas observaciones es tentador especular que el altísimo nivel de conservación en las enolasas puede deberse a compromisos funcionales asociados a interacciones proteína-proteína, funciones regulatorias y otros roles diferentes a la catálisis (ver Tabla 2). De hecho, la sorprendente multiplicidad de funciones de la enolasa sirvió como modelo para acuñar el término *Gene sharing* (Piatigorsky *et al.*, 1989), el cual implica que un gen produce un polipéptido que tiene más de una función.

**Tabla 2. Diversos roles funcionales de enolasa.**

<b>Función</b>	<b>Organismo</b>	<b>Referencia</b>
Unión a plasminógeno humano en procesos infecciosos.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bergmann <i>et al.</i> , 2001
Unión a plasminógeno humano en procesos infecciosos.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Pancholi <i>et al.</i> , 1998
Regulación de la expresión de <i>c-myc</i> (regulador del crecimiento y diferenciación celular) como <i>Myc Binding Protein</i> (MBP-1) con un inicio de traducción alternativo.	<i>Homo sapiens</i>	Subramanian <i>et al.</i> , 2000
Importación mitocondrial específica para tRK1 (tRNA <sub>Lys</sub> <sup>CUU</sup> ).	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Entelis <i>et al.</i> , 1996
Forma parte de un complejo multienzimático que destruye mRNA del transportador transmembranal de glucosa <i>ptsG</i> (RNA degradosoma).	<i>Escherichia coli</i>	Chandran <i>et al.</i> , 2006
HSP48, resistencia térmica y control del crecimiento regulado por <i>HSR1</i> ( <i>Heat Shock Resistant</i> ).	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lida <i>et al.</i> , 1985
Como <i>t</i> -cristalina principal componente de las lentes oculares en forma de monómero, carente de Mg <sup>2+</sup> y muy baja actividad.	Peces, reptiles, aves y lampreas	Wistow <i>et al.</i> , 1988

### 1.3. Evolución convergente de la función enzimática

En la evolución convergente, las enzimas evolucionan en contextos biológicos distintos para catalizar reacciones idénticas o similares (Gherardini *et al.*, 2007). Estrictamente, estas enzimas no tienen más en común que sus funciones; sin embargo, existen muchos casos estudiados en los que enzimas con plegamientos distintos emplean los mismos residuos y la misma geometría, por lo que emplean el mismo mecanismo de reacción (O' Boyle *et al.*, 2007). Un ejemplo de la convergencia funcional de enzimas son las serín proteasas. En este sistema, la triada catalítica Ser-His-Asp de la familia de la tripsina se encuentra formando la misma geometría en las subtilisinas no homólogas y estructuralmente distintas (Kraut, 1977).

En contraste, es importante diferenciar los casos en los que dos enzimas catalizan la misma reacción global, empleando diferentes estrategias mecánicas para este fin. Tal es

el caso de las dehidroquinato deshidratasas (DHQasas) tipo I y II que se distinguen por sus mecanismos de reacción, estequiometría, secuencia y estructura (White *et al.*, 1990). Las 3-DHQasas tipo I son barriles ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> y llevan a cabo una eliminación tipo E1 (Wen-Hwa *et al.*, 2002). Estas enzimas emplean un intermediario imino para catalizar una *syn*-eliminación vía un complejo enzima-sustrato covalentemente unido. Las DHQasas tipo II adoptan el plegamiento de la flavodoxina. Su mecanismo de reacción involucra un intermediario enolato en una *trans*-eliminación tipo E1cB. En este sentido, más allá de la conversión global de un sustrato en producto empleando la misma maquinaria catalítica, el reclutamiento de mecanismos de reacción, inclusive entre grupos de enzimas no homólogas, es evidente.

#### **1.4. Potencial evolutivo de los barriles ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>**

Un ejemplo de la versatilidad funcional del plegamiento ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> en términos evolutivos, y particularmente de los miembros de la superfamilia de las enolasas, es la obtención de la actividad promiscua *O*-Succinil Benzoato Sintasa (OSBS) en L-Ala-D/L-Glu epimerasa (AEE) de *E. coli* y MLE de *Pseudomonas* sp., a través del reemplazo de un solo aminoácido. Esto fue logrado empleando diseño racional en el caso de AEE, y mutagénesis aleatoria en MLE (Vick *et al.*, 2003), lo que muestra que pequeños cambios (un simple residuo), permiten la adquisición de nuevas actividades. En este caso, se destaca el reclutamiento de un atributo mecanístico importante.

#### **1.5. Ingeniería de proteínas y diseño computacional de enzimas**

Con la llegada de la mutagénesis sitio dirigida y la capacidad de alterar la secuencia, la estructura y la función de las proteínas, surgió la expectativa de alterar aminoácidos

racionalmente para obtener nuevas funciones, lo cual dio origen a la ingeniería de proteínas (ver revisión por Peisajovitch *et al.*, 2007). Con el tiempo, se ha puesto de manifiesto que esta tarea no es fácil, y que es indispensable tomar en cuenta los procesos evolutivos que suceden en la naturaleza para ser exitoso en el diseño e ingeniería de proteínas.

En la búsqueda de nuevas funciones enzimáticas, cambios de especificidad por sustrato, enantioselectividad, o la adaptación de una reacción natural a nuevas condiciones (por ejemplo, cambio del pH, temperatura, o solvente), la mayoría de los esfuerzos a la fecha han empleado la selección de variantes procedentes de bibliotecas mutagénicas. Para este fin, se suelen adoptar técnicas de evolución dirigida, la cual emplea diversos métodos moleculares para la generación aleatoria de mutaciones en la secuencia de una proteína. Las bibliotecas son sometidas a un proceso de selección del cual se obtienen las variantes que han adquirido la(s) mutación(es) necesarias para la aparición de la característica deseada. La exploración del espacio de secuencia de una proteína, tanto como sea posible, implica la construcción de grandes librerías, y como consecuencia, el desarrollo de métodos de tamizado eficientes (*screening*) para el aislamiento de las variantes deseadas. El uso de robots para este fin ha hecho esta tarea más sencilla, sin embargo, en el caso de sistemas que no permiten la selección positiva (por ejemplo, enantioselectividad o reacciones no-naturales) este esfuerzo resulta muy costoso y complejo. Por otro lado, se ha propuesto (Reetz *et al.*, 2008) la construcción de bibliotecas más pequeñas y mejor dirigidas, lo cual se ve reflejado en un menor esfuerzo de tamizado, así como en un mayor número de variantes aisladas con la propiedad deseada. Así mismo el tamaño de las bibliotecas se ha visto reducido a través del uso de herramientas computacionales.

Recientemente, a través de diseño computacional se han logrado obtener nuevos plegamientos (Kuhlman *et al.*, 2003), crear interacciones para el reconocimiento de

ligandos (Looger *et al.*, 2003), además de que se han logrado obtener enzimas con actividades artificiales explorando un número limitado de variantes (Jiang *et al.*, 2008, Röthlisberger *et al.*, 2008). En un trabajo publicado en el 2008 por Jiang y colaboradores se logró obtener retroaldolasas activas a través de diseño computacional. El método empleado está basado en el diseño previo de la geometría de sitios activos ideales para la catálisis deseada, y la búsqueda de estas coordenadas en colecciones de estructuras ya existentes. Para este fin se buscaron carbonos alfa que permiten la localización de los residuos y rotámeros seleccionados, lo que resultó en una serie de posibles templados de entre los cuales se seleccionó a los mejores de acuerdo a un sistema de *ranking* (Zhangellini *et al.*, 2007). A continuación, los aminoácidos existentes se reemplazaron por los seleccionados a través de mutagénesis sitio dirigida, y se evaluó la función enzimática. Posteriores ajustes de los diseños permitieron la obtención de enzimas con capacidad para realizar la ruptura de enlaces carbono-carbono asistida por agua en dos plegamientos distintos. A pesar de que la capacidad catalítica de estas enzimas diseñadas *de novo* es muy pobre, quedó demostrado que es posible obtener enzimas activas a través de un enfoque de diseño computacional. Sin duda la combinación del diseño computacional para crear predicciones de las soluciones óptimas, la selección cuidadosa del templado, en conjunto con técnicas de evolución dirigida para la optimización de los diseños, permitirá obtener en el futuro mejores resultados en el campo de la ingeniería de proteínas (Röthlisberger *et al.*, 2008).

### **1.6. Métodos de selección y tamizado**

El mayor reto en la evolución dirigida es identificar algunas pocas moléculas con una característica deseada dentro de una gran población de variantes. Existen dos enfoques para alcanzar este fin: (i) Análisis individual *in vitro* de los miembros de la población o

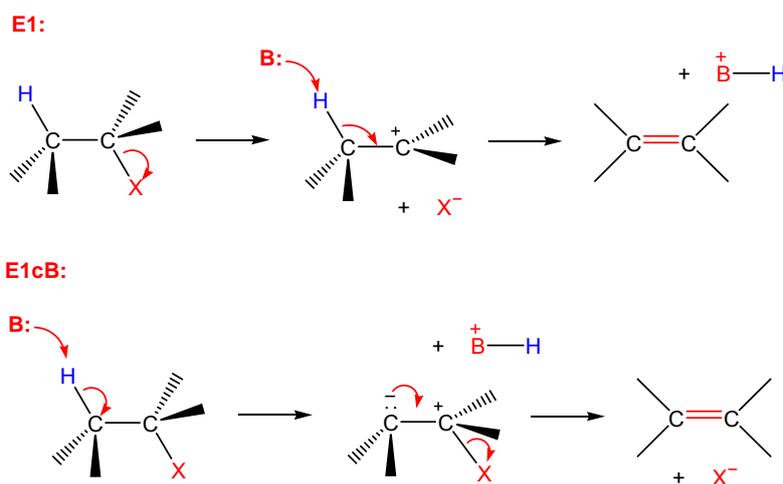
tamizado, ó (ii) probando la capacidad de realizar la función deseada *in vivo* en toda la población al mismo tiempo, permitiendo sólo a las clonas (variantes) deseadas aparecer (selección positiva) (Jäckel *et al.*, 2008). Para el primer caso, se han desarrollado técnicas químicas, biológicas e inmunológicas para una rápida evaluación de las actividades enzimáticas, o del reconocimiento de un ligando. Estas técnicas pueden estar basadas en la detección de productos de reacción fluorescentes o coloreados, o empleando cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), espectrometría de masas (MS), o espectroscopía por resonancia magnética nuclear (NMR). Estas metodologías permiten analizar bibliotecas de  $10^2$  - $10^4$  variantes. Para el tamizado de bibliotecas de mayor número de variantes, se ha propuesto el uso de la técnica *Fluorescent Activated Cell Sorting* (FACS), con la cual se pueden analizar  $10^5$  clonas por segundo (Jäckel *et al.*, 2008). Dada esta flexibilidad y los avances en automatización es de esperarse que esta capacidad de análisis se incremente en el futuro.

En el caso de la selección, se evalúa la capacidad de una proteína para complementar un defecto metabólico o proveer resistencia contra alguna toxina. Las condiciones de selección permiten la supervivencia de las células que contienen las moléculas que han adquirido la función deseada. Esto permite el análisis simultáneo de todos los miembros de la población, por lo que se pueden evaluar bibliotecas de más de  $10^8$  variantes, lo cual es imposible a través de sistemas de tamizado.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Mecanismos de eliminación

Entre las reacciones de eliminación se distinguen tres mecanismos relacionados con la secuencia de la ruptura de los enlaces C-H y C-X. Estos mecanismos son E1, E2 y E1cB. (Figura 2) En el mecanismo E1, el enlace C-X es escindido dando lugar a la formación de un intermediario carbocatión; a continuación se abstrae el H<sup>+</sup> para producir un alqueno. En el mecanismo E2 la ruptura del enlace C-H es simultáneo a la ruptura del enlace C-X, produciendo un alqueno en un solo paso. Este mecanismo, hasta donde sabemos, no se presenta en reacciones catalizadas por enzimas. El mecanismo E1cB inicia con la abstracción de un protón, seguido de la pérdida de X<sup>-</sup> con la formación de un intermediario carbanión. El mecanismo de eliminación más frecuente en la naturaleza es E1cB (McMurry *et al.*, 2005). Estas consideraciones mecanísticas representan uno de los principales antecedentes para el presente proyecto.



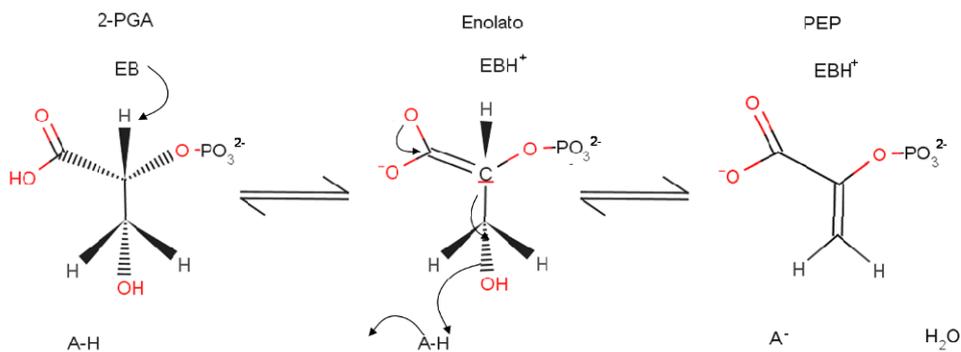
**Figura 2. Distintos mecanismos de eliminación presentes en la naturaleza.** En la eliminación E1 el enlace C-X es escindido en primer lugar, dando lugar a la formación de un carbocatión, seguido de la abstracción de un protón. En la eliminación tipo E1cB, la abstracción de un protón da lugar a la formación de un intermediario enolato (carbanión) y la reacción es resuelta en un último paso variable. B = base, X<sup>-</sup> = grupo saliente.

## 2.2. Actividad de deshidratación de la enolasa

Como ya se mencionó anteriormente, la enolasa cataliza la deshidratación de 2-PGA a través de la  $\beta$ -eliminación ácida de -OH del C3, a través de un carbanión enolato intermediario, que se forma a consecuencia de la remoción del protón de C2 de 2-PGA por una base conservada (Reed *et al.*, 1996). La formación de un carbanión y la salida del OH en forma secuencial implican que el mecanismo de reacción es una eliminación tipo E1cB (Figura 3). Estructuralmente, el dominio N-terminal proporciona un *loop* flexible (20's) que cierra el sitio activo. Éste, y el movimiento de otro *loop* en el barril, son cambios conformacionales relacionados con la unión del sustrato al sitio activo. Cuando 2-PGA se une al sitio activo de la enolasa, su carboxilo es rotado y neutralizado por interacciones con Gln167, Lys396 y los dos iones de  $Mg^{2+}$ , designados como  $Mg^{2+}$  catalítico y  $Mg^{2+}$  conformacional; el *loop* Ser36-His43 se mueve de tal modo que la Ser39, en coordinación con el ion de  $Mg^{2+}$  conformacional, cierran el sitio activo. Los *loops* Val153-Phe169 (*loop* 1) y Ser250-Glu277 (*loop* 2) se mueven de tal modo que la His159 inicia el ciclo catalítico donando un protón al fosforilo de 2-PGA. El pKa del C2 de 2-PGA es disminuido gracias a las interacciones con la Arg374 y con el ion  $Mg^{2+}$  catalítico (Brewer *et al.*, 2000). La Lys345 se acerca a la Arg374 para que la primera pierda un protón y pueda aceptar uno del C2 de 2-PGA. Un protón compartido por el Glu168 y el Glu211 forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo de 2-PGA, el cual pasa del carboxilato al hidroxil saliente, formándose finalmente  $H_2O$  y PEP (Zhang *et al.*, 1997). Los residuos involucrados en el ciclo catalítico de la enolasa de levadura son mostrados en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Residuos catalíticos de la enolasa de levadura.

Residuo	Función	Referencias
Lys396	En conjunto con el ión $Mg^{2+}$ catalítico estabiliza al 2-PGA interactuando con O de su carboxilato.	Zhang <i>et al.</i> , 1997; Wedekind <i>et al.</i> , 1994, Poyner, 1996; Reed <i>et al.</i> , 1996.
Arg374	En conjunto con el ión $Mg^{2+}$ catalítico neutraliza la cara del fosfato, desprotona a la Lys345 activándola.	Zhang <i>et al.</i> , 1997.
Lys345	Abstrae el protón del C2 del 2-PGA.	Zhang <i>et al.</i> , 1997; Poyner <i>et al.</i> , 1996; Wedekind <i>et al.</i> , 1994; Reed <i>et al.</i> , 1996.
Glu211	Actúa como el ácido general activando a $H_2O$ , que dona un protón al grupo hidroxilo saliente.	Lebioda <i>et al.</i> , 1991, Sims <i>et al.</i> , 2003; Reed <i>et al.</i> , 1996, Poyner <i>et al.</i> , 1996 Brewer <i>et al.</i> , 1997.
Glu168	En conjunto con Glu211 mantiene unido $H_2O$ que dona un protón.	Lebioda & Stec, 1991; Sims <i>et al.</i> , 2003, Reed <i>et al.</i> , 1996. Brewer <i>et al.</i> , 1997.
Gln167	En conjunto al ión $Mg^{2+}$ catalítico estabiliza al 2-PGA interactuando con O de su carboxilato.	Zhang <i>et al.</i> , 1997.
His159	Protona el fosfato del 2-PGA polarizándolo, colaborando con la eliminación del protón del C2.	Zhang <i>et al.</i> , 1997; Brewer <i>et al.</i> , 2003.
Ser39	Cierra un <i>loop</i> permitiendo el cambio conformacional a la forma activa, excluye agua y reduce la constante dieléctrica del sitio activo, se une al ión $Mg^{2+}$ conformacional.	Wedekind <i>et al.</i> , 1994, Sims <i>et al.</i> , 2003, Reed <i>et al.</i> , 1996.



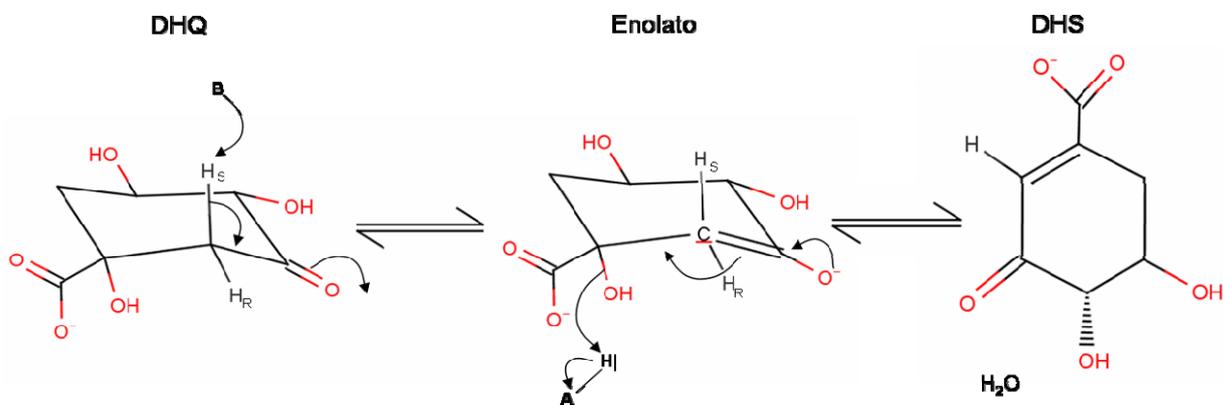
**Figura 3. Mecanismo de propuesto para la enolasa.** La deshidratación de 2-fosfoglicerato (2-PGA) para producir fosfoenol piruvato (PEP), es una eliminación tipo E1cB, una base enzimática (EB) abstrae un protón y forma un enolato. Finalmente, un ácido (A-H) dona un protón al OH saliente y se libera una molécula de agua.

### 2.3. Actividad enzimática de la 3-dehidroquinato deshidratasa tipo II

La vía del shikimato, presente únicamente en microorganismos y plantas, une el metabolismo de carbohidratos con la biosíntesis de compuestos aromáticos. A partir de esta ruta se sintetizan los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. DHQasa (EC 4.2.1.10) cataliza la tercera reacción de la vía deshidratando 3-dehidroquinato (DHQ), para producir 3-dehidroshikimato (DHS). Estructuralmente, las DHQasas tipo II son dodecámeros que adoptan el plegamiento de la flavodoxina, como ya se mencionó anteriormente en la sección 1.3. Este plegamiento consiste de una proteína  $\alpha/\beta$  con 5 laminas  $\beta$  paralelas, además de 4 hélices principales en su estructura. El sitio activo de DHQasa tipo II está ubicado en la cavidad formada entre  $\beta_1$  y  $\beta_3$ , mientras que un *loop* flexible formado por los residuos 21 al 31 forma una tapa que cubre el sitio activo (numeración de la enzima de *Streptomyces coelicolor*, PDB: 1GTZ). En esta región se encuentra la Tyr28, que gracias a la interacción con la Arg113 y la Arg23, (en la conformación cerrada) mantiene un pKa adecuado para la abstracción del protón *pro-S* del C2 de DHQ. La reacción procede vía la formación de un intermediario enolato con un doble enlace entre el carbono 2 y 3 (Figura 4). Para la estabilización del enolato se emplea una molécula de agua que se encuentra orientada por puentes de hidrogeno. El siguiente paso de la reacción es la eliminación del hidroxilo de C1; la His106 actúa como el donador del protón, liberando finalmente una molécula de H<sub>2</sub>O y DHS (Roszak *et al.*, 2002). Los residuos catalíticos de la DHQasa tipo II de *S. coelicolor* se muestran en la Tabla 4. La secuencia en la que procede la deshidratación de 3-DHQ en la reacción catalizada por las DHQasas tipo II es característica de las eliminaciones tipo E1cB.

**Tabla 4.** Residuos catalíticos de 3-DHQasa tipo II de *S. coelicolor* (Roszak *et al.*, 2002)

Residuo	Función
Pro15	Orienta una molécula de H <sub>2</sub> O que estabiliza al enolato.
Asn16	Orienta una molécula de H <sub>2</sub> O que estabiliza al enolato.
Ala81	Orienta una molécula de H <sub>2</sub> O que estabiliza al enolato.
Ala79	Aceptor de puente de H con el carboxilo (C1) de DHQ.
Arg23	Interactúa con el grupo carboxilato de DHQ. Ajusta el pKa de la Tyr28.
Tyr28	Abstrae el protón.
Glu104	Forma un puente de H con la His106 orientándola correctamente.
His106	Dona un protón al hidroxilo saliente y forma un puente de H con DHQ.
Arg113	Interactúa con el grupo carboxilato de DHQ. Forma un puente de H con la Tyr28 en la conformación cerrada (ajusta el pKa de Tyr28).



**Figura 4. Mecanismo de reacción propuesto para DHQasa tipo II.** La deshidratación de dehidroquinato (DHQ) para producir dehidroshikimato (DHS), es llevada a cabo empleando un mecanismo E1cB; una base abstrae un protón ácido en el C2 del anillo, posteriormente se forma un enolato, y un ácido dona un protón al OH en C1, liberando una molécula de agua.

## **2.4. Relaciones entre DHQasas y enolasas**

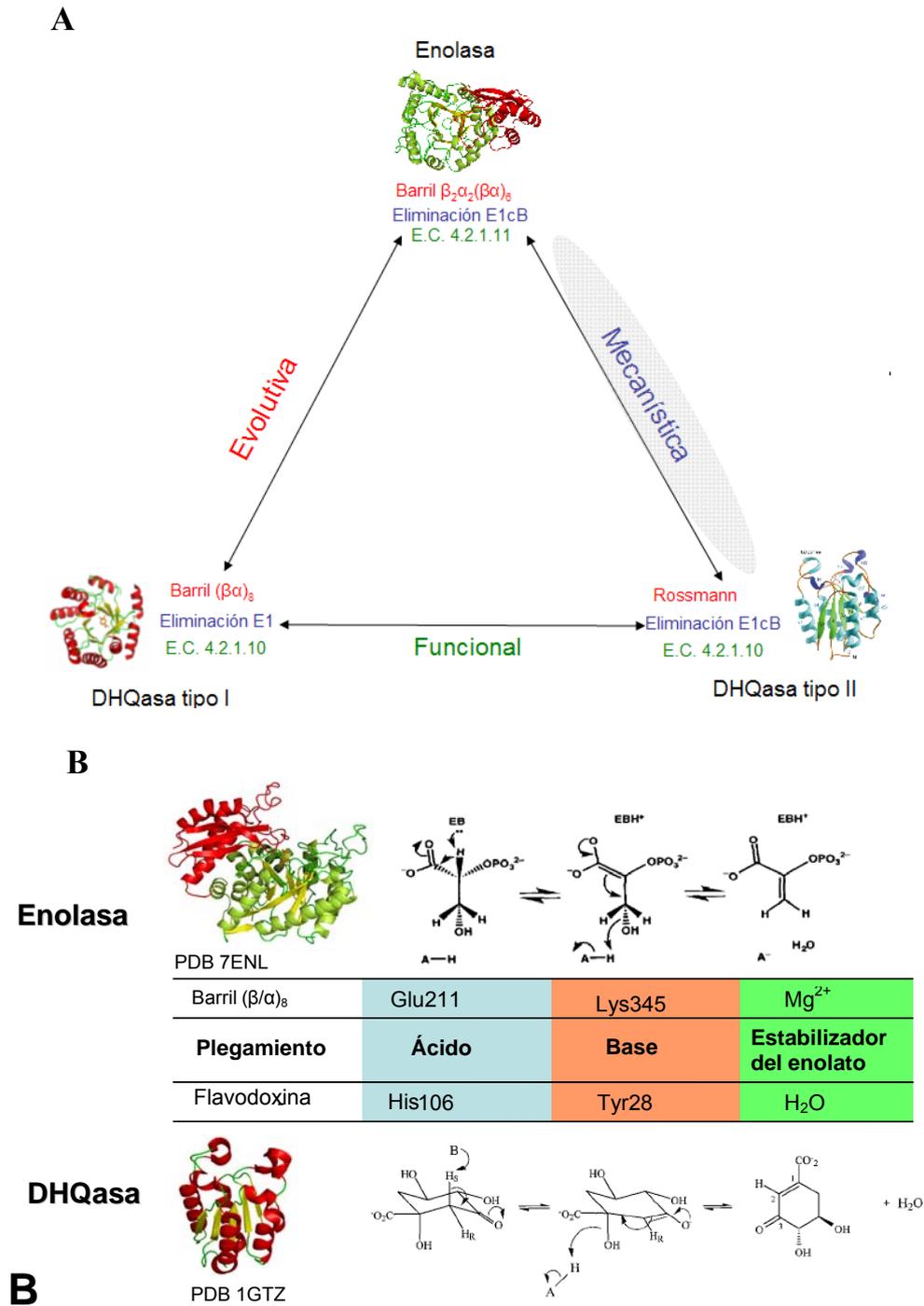
Empleando el marco conceptual de las superfamilias de enzimas mecanísticamente diversas y con el fin de ubicar enzimas con relaciones funcionales, mecanismos de reacción y plegamientos, se pueden establecer características comunes y distintas entre las DHQasas y las enolasas (Figura 5A).

### **2.4.1. Relaciones mecanísticas**

La enolasa y la DHQasa tipo II comparten el mecanismo E1cB, que involucra la abstracción de un protón y la protonación de un grupo saliente, a pesar de la clara diferencia entre los sustratos de ambas enzimas (Figura 5B). Ambos sitios activos poseen un ácido y una base catalítica, cuyas identidades difieren, aunque la geometría de ambos sitios activos es muy similar. La relación mecanística entre DHQasas tipo II y la enolasa será abordada en el desarrollo del presente trabajo.

### **2.4.2. Relaciones estructurales y funcionales**

La enolasa y la DHQasa tipo I pertenecen al grupo estructural de barriles ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, lo cual sugiere divergencia a partir de un ancestro común, a pesar de catalizar reacciones distintas y emplear para ello mecanismos de reacción diferentes. Por otra parte, DHQasa tipo I y II, con plegamientos distintos, llevan a cabo la misma función mediante mecanismos diferentes. Finalmente, la enolasa y DHQasa tipo II tienen funciones y sustratos distintos, aunque comparten el mismo mecanismo de reacción.



**Figura 5. Relaciones evolutivas, funcionales y mecanísticas entre enolasa, DHQasa tipo I y II.** En este proyecto se abordará la relación mecanística entre enolasa y DHQasa tipo II presentadas en la Figura 5A. En la Figura 5B se indican los elementos de ambas enzimas que comparten roles funcionales.

## **2.5. Consideraciones teóricas sobre el modelo experimental Enolasa-DHQasa tipo II**

La selección natural origina enzimas en respuesta a la rapidez con que suceden los cambios en el entorno de un organismo, lo que se traduce a la capacidad de adaptación de este último. Por lo tanto, estos rasgos pueden ser características seleccionables por sí mismas, es decir, es posible que la naturaleza seleccione algunas proteínas por su capacidad para adquirir nuevas funciones, por ejemplo, la unión promiscua de un sustrato, o la capacidad de aceptar mutaciones sin perder estabilidad, antes que por su especificidad o eficiencia catalítica (O'Loughlin *et al.*, 2006). O'Loughlin y colaboradores recomendaron en el 2006 que antes de emprender un estudio de ingeniería de proteínas, se consideren características como la historia natural del templado proteico. En este trabajo, para la selección del templado se han de considerar los siguientes dos aspectos: (i) el potencial evolutivo del templado proteico; y (ii) la historia natural de las relaciones de paralogía.

### **2.5.1. La evolvabilidad en la ingeniería de proteínas**

La evolvabilidad es la capacidad de un linaje para evolucionar, es decir, su capacidad de generar variación fenotípica heredable y que puede ser seleccionada. La evolvabilidad tiene dos componentes: (i) reducir la letalidad de las mutaciones; y (ii) reducir el número de mutaciones necesarias para producir nuevos fenotipos. (Kirschner *et al.*, 1998). Las consecuencias de una mutación respecto al cambio fenotípico están condicionadas al contexto metabólico en el que suceden, al desarrollo del organismo y al medio en el que se encuentran (Kirschner *et al.*, 1998). En el contexto de la evolvabilidad de las enzimas, se ha observado que la actividad primaria de un miembro de una superfamilia, puede ser la actividad promiscua de otro miembro, y que las actividades promiscuas pueden servir como puntos de inicio para la evolución de nuevos miembros

(Afriat *et al.*, 2002; Glasner *et al.*, 2006a). Debido a que los miembros de una superfamilia comparten atributos mecánicos, se trata entonces de la unión promiscua de los sustratos y su posterior especialización.

Las funciones enzimáticas dependen del arreglo tridimensional de la proteína, la cual es mantenida por una red de interacciones entre los aminoácidos que la conforman. Se ha observado que la constitución de los sitios activos no favorece la estabilidad de las enzimas, esto se debe a la presencia de residuos cercanos con carga similar, o residuos polares en cavidades hidrofóbicas (Nagatani *et al.*, 2007). Cuando los residuos del sitio catalítico son reemplazados con aminoácidos sin carga y de cadena corta, normalmente la pérdida de la función enzimática viene acompañada de un incremento en la estabilidad, mientras que en el caso de la adquisición de nuevas funciones se ha observado que esta tiene como consecuencia la disminución de la estabilidad (Tokuriki *et al.*, 2008). Esto debe ser considerado cuando se pretende alcanzar una nueva función a través de evolución *in vitro*, debido a que además de los cambios necesarios para la adquisición de la nueva función, se deben realizar cambios de aminoácidos que restablezcan la estabilidad de la proteína.

Por otro lado, el sistema de selección debe ser diseñado tomando en consideración el entorno metabólico de la función a seleccionar debido a que posiblemente se obtengan variantes con un desempeño muy bajo para la nueva función. La enolasa, además del papel glicolítico (sección 2.2.), desempeña muy diversas funciones (sección 1.2.5.). Estos compromisos funcionales hacen de la enolasa un templado con poca capacidad para la adquisición de una nueva función. Sin embargo, debido a los diversos roles que desempeña,

queda claro que esta proteína ha sido reclutada para evolucionar nuevas funciones en más de una ocasión.

### **2.5.2. Relaciones de paralogía en la ingeniería de proteínas**

De acuerdo al modelo de neo-funcionalización, la nueva función aparece después de la duplicación en una de las copias, mientras que la otra copia mantiene la función original y la segunda copia es seleccionada para realizar la nueva función (sección 1.1.). En este modelo, a consecuencia de la selección purificadora que actúa para mantener la función original en la copia ancestral, solo una copia sufre cambios adaptativos. Por otro lado, en el modelo de sub-funcionalización, la nueva función surge primero en la copia del gen ancestral, que de manera promiscua cataliza la nueva función, lo cual puede resultar en una reducción en la capacidad para realizar la función original. Posteriormente a la duplicación, cada copia puede sufrir cambios para especializarse en la función original o nueva. Así, independientemente del modelo que opere en la naturaleza, no queda duda alguna sobre la importancia de la duplicación como un indicio de la posibilidad de adquisición de una nueva función. En el presente trabajo hemos considerado la paralogía como un criterio de selección del templado con el objetivo de reclutar una enolasa probablemente liberada de los compromisos funcionales de la glicolisis y con mayor potencial evolutivo.

### **2.6. Consideraciones metodológicas**

La disponibilidad de una amplia gama de herramientas bioinformáticas, hace accesible el uso de estrategias de diseño computacional para la obtención de nuevas funciones enzimáticas. El uso de estas herramientas disminuye el esfuerzo en la construcción de bibliotecas mutagénicas, dirigiéndolo a un grupo reducido de residuos al permitir la

exploración *in silico* de un gran número de posibles soluciones para la nueva función. En lo concerniente a los métodos de aislamiento de variantes con la función deseada, una ventaja importante de los sistemas de selección positiva, es la posibilidad de ajustar la intensidad de la selección, cambiando la concentración del sustrato (Bershtein *et al.*, 2006), los niveles de expresión de la proteína a evaluar, o ajustando el flujo metabólico de la vía donde intervendrá la función a seleccionar (Kleeb *et al.*, 2007). La selección de una nueva función enzimática obtenida *in vitro* en un sistema de selección positiva relajada, permite aislar variantes con eficiencias catalíticas bajas, que no podrían detectarse con umbrales de selección muy fuertes. Ambas consideraciones serán explotadas en los esfuerzos de ingeniería de proteínas y selección del presente trabajo.

### **3. Hipótesis**

En el proceso evolutivo que conduce a la aparición de nuevas enzimas, los mecanismos de reacción muestran autonomía sobre la especificidad de sustrato y sobre el plegamiento proteico que alberga la actividad enzimática.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. Objetivo general**

Llevar a cabo la ingeniería de una enolasa seleccionada *ad hoc*, con la finalidad de que deshidrate dehidroquinato (actividad dehidroquinato deshidratasa tipo II) lo que será seleccionado *in vivo* y su actividad y mecanismo de reacción confirmada *in vitro*.

#### **4.2. Objetivos específicos**

1. Seleccionar una enolasa templado que facilite los esfuerzos de ingeniería de proteínas.
2. Caracterizar la función enzimática *in vivo* de la enolasa seleccionada, particularmente en términos de promiscuidad catalítica.
3. Emplear ingeniería de proteínas para obtener especificidad por dehidroquinato en la enolasa seleccionada
4. Caracterizar la actividad Dehidroquinato deshidratasa tipo II evolucionada en la enolasa seleccionada.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1. Métodos bioinformáticos**

#### **5.1.1. Búsqueda de enolasas parálogas**

Para identificar las enolasas candidatas, se tomaron 378 secuencias de enolasas almacenadas en la base de datos SFLD (Pegg *et al.*, 2006). Se eliminaron aquellas con identidad superior al 94% empleando Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009), a las cuales se agregaron las secuencias identificadas con perfiles de modelos ocultos de Markov (HMM), obtenidos a partir de un alineamiento de secuencias de enolasas caracterizadas estructural y funcionalmente, el alineamiento fue rectificado con información de firmas funcionales y estructurales, y finalmente fue comparado con los alineamientos disponibles en la SFLD. Para la identificación de enolasas parálogas se empleó un programa escrito por Mariana Matus García en el lenguaje PERL para la búsqueda automatizada en una base de datos de alrededor de 500 genomas completos obteniendo un total de 206 secuencias.

Todos los alineamientos de secuencias se construyeron empleando Muscle 3.6 (Edgar, 2004), los perfiles HMM se construyeron con HMMER (Eddy, 1998) y los árboles filogenéticos se construyeron empleando MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck *et al.*, 2001). Para los arboles que se muestran en las figuras 6 y 1A, se emplearon los siguientes parámetros: prset aamodelpr=fixed(jones), mcmc ngen=500000, samplefreq=100, nchains=4; sumt burnin=1000, sump burnin=1000.

#### **5.1.2. Rediseño del sitio activo de enolasa de levadura**

Para el rediseño del sitio activo de la enolasa de levadura se usó el proceso de diseño de *Dezymer*, un programa que construye sitios de unión a un ligando en estructuras tridimensionales conocidas (Hellings *et al.*, 1991). De acuerdo a este proceso de diseño se

defirieron residuos como la *Evolving*, la *molten* y la *fixed zone* empleando la herramienta *around* de pyMol (Delano WL, 2002). Para las superposiciones estructurales se empleó STAMP 4.2, *Structural Alignment of Multiple Proteins* (Russell *et al.*, 1992) con los parámetros *default*, STAMP permite realizar alineamientos múltiples de secuencia basados en estructura terciaria.

Se analizaron un total de 11 estructuras cristalográficas de enolasa (Anexos - Tabla A3), 8 de DHQasa tipo I (Anexos - Tablas A4) y 16 de DHQasa tipo II (Anexos - Tabla A5) todas procedentes del Protein Data Bank (PDB). Las coordenadas de los carbonos a los que se unen los protones que son abstraídos, el grupo hidroxilo saliente y el carbono intermedio en los ligandos de la enolasa y DHQasa se superpusieron empleando la herramienta *pair\_fit* de pyMol (Delano WL, 2002). De este modo se obtuvo una superposición de los sitios activos de DHQasa y de la enolasa basada en los elementos estructurales determinantes del mecanismo de reacción, la cual denominamos superposición funcional.

El ligando DHQ fue extraído de la estructura cristalográfica 1J2Y, se agregaron hidrógenos con pyMol y la estructura fue minimizada con proDRG2 (Schuttelkopf *et al.*, 2004), manteniendo fijas las posiciones del grupo carboxilo y el hidroxilo saliente, se asignaron cargas automáticamente empleando Jchem (ChemAxon), estas se ajustaron a mano arbitrariamente (Anexos - Figura 2AA). Se creó una biblioteca de ligandos con 25 combinaciones de ángulos de torsión entre 0 y 90° a partir del ángulo en la estructura minimizada para los enlaces C3-O3 y C4-O4 con la herramienta *torsión* de pyMol (Anexos - Figura 2AB), finalmente esta librería fue empleada para la búsqueda de nuevas interacciones en el complejo enolasa-DHQ (2ONE/DHQ) obtenido en la superposición funcional.

## 5.2. Métodos de biología molecular

### 5.2.1. Clonación

Los genes de las enolasas *eno* de *E. coli* y *Sco7638* y *Sco3096* de *S. coelicolor* fueron amplificados por PCR con los oligonucleótidos y sitios de restricción mostrados en la Tabla 5, los productos fueron clonados en los vectores de expresión pGEX 4T-1 (GE Healthcare), pET21(a) y pET15(b) (Novagen).

Las enzimas de restricción y ligasas fueron producidas por New England BioLabs y las polimerasas fueron producidas por Fermentas. Todos los plásmidos generados fueron secuenciados para comprobar su correcta construcción.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos empleados en la construcción de los plásmidos de expresión.

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de restricción	Construcción	Características
5_7638_pET21a	CGGCATATGTCCGCA ACAGCAGT	<i>NdeI</i>	pET21_ <i>Sco7638</i>	6XHis-tag C-terminal
3_7638_pET21a	CTTCTCGAGGACCCG GCGCAGCG	<i>XhoI</i>		
3_7638_pET15b	CTTCTCGAGTCAGAC CCGGCGCAGC	<i>XhoI</i>	pET15_ <i>Sco7638</i>	6XHis-tag N-terminal
5_7638_pGEX	TCCCGGATCCATGTC CGCAACAGCA	<i>BamHI</i>	pGEX_ <i>Sco7638</i>	Fusión N-terminal a GST
3_7638_pGEX	GCCGAATTCTCGCGA CTCAGACC	<i>EcoRI</i>		
5_3096_pET21a	GACCATATGGTGCCG TCCATCGA	<i>NdeI</i>	pET21_ <i>Sco3096</i>	6XHis-tag C-terminal
3_3096_pET21a	GCTGCGGCCGCGCCC TTGAAGCGGG	<i>NotI</i>		
3_3096_pET15b	GTTGGATCCTCAGCC CTTGAAGCGG	<i>NotI</i>	pET15_ <i>Sco7638</i>	6XHis-tag N-terminal
5_3096_pGEX	GCTCGGATCCGTGCC GTCCATC	<i>BamHI</i>	pGEX_ <i>Sco7638</i>	Fusión N-terminal a GST
3_3096_pGEX	CCTGAATTCTACGACG CTGCCTTCTACC	<i>EcoRI</i>		
5_enocoli_pGEX	GAGGAAGGATCCAT GTCCAAAATCG	<i>BamHI</i>	pGEX_ <i>enocoli</i>	Fusión N-terminal a GST
3_enocoli_pGEX	AATCAGGCGGCCGC AGTCTTAT	<i>NotI</i>		

### 5.2.2. Construcción de bibliotecas mutagénicas

La biblioteca mutagénica de enolasa de levadura fue ensamblada por PCR empleando nucleótidos con posiciones degeneradas (Figura 13 y Tabla 6) y el producto

ensamblado fue clonado en el vector pQE30 (Qiagen) con los sitios *Bam*HI y *Pst*I; este vector posee un promotor T5 que está regulado por el sistema *lac*, y no contiene el represor *lac*I por lo que el gen clonado se expresa constitutivamente. La ligación de los productos de PCR y el vector digerido se transformó por electroporación en células *E. coli* MC1061, y se sembró en placas de LB / ampicilina, las placas se incubaron a 30 °C por 16 horas. Las colonias resistentes a ampicilina fueron recuperadas lavando las placas con medio LB estéril, de esta suspensión se extrajeron los plásmidos que constituyeron la biblioteca mutagénica Aro-Eno, se extrajeron plásmidos de colonias sencillas al azar para caracterizar la biblioteca. Las enzimas de restricción y las ligasas empleadas fueron producidas por New England BioLabs y las polimerasas fueron producidas por Fermentas.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos empleados para la construcción de la biblioteca mutagénica Aro-Eno.

Oligonucleótido	Bases	Secuencia*
FOR_pQE_eno1SCE	22	CAGAGGATCCATGGCTGTCTCT
REV_pQE_eno1SCE	22	GATCCTGCAGTTATAATTTGTC
FOR_E168NNS	39	GGTGCTTTGGCTTTGCAANNSTTTATGATTGCTCCAAC
REV_E168NNS	39	AGTTGGAGCAATCATAAASNNTTGCAAAGCCAAAGCACC
FOR_D246GBT	39	AAGATCAAGATCGGTTTGGBTGTGCTTCTCTGAATTC
REV_D246GBT	39	GAATTCAGAGGAAGCACAAVCCAACCGATCTTGATCTT
FOR_E295GBT	39	TACCCAATTGTCTCCATCGBTGATCCATTTGCTGAAGAT
REV_E295GBT	39	ATCTTCAGCAAATGGATCAVCGATGGAGACAATTGGGTA
FOR_V318ARN_D320GBT	45	ACCGCTGGTATTCAAATTARNGCTGBTGACTTGACTGTACCAAC
REV_V318ARN_D320GBT	45	GTTGGTGACAGTCAAGTCAVCAGCNYTAATTTGAATACCAGCGGT
FOR_L343DYG	39	AAGGCTGCCGACGCTTTGDYGTGAAGGTCAACCAAATC
REV_L343DYG	39	GATTTGGTTGACCTTCAACRHCAAAGCGTCGGCAGCCTT
FOR_K396VTH	39	TTGAGAACTGGTCAAATCVTHACTGGTGCTCCAGCTAGA
REV_K396VTH	39	TCTAGCTGGAGACCAGTDABGATTTGACCAGTTCTCAA

\*Posiciones degeneradas: B = CGT, V = ACG, H = ATC, N = ATCG, R = AG, S = CG.

### 5.2.3. Mutación de *Sco3096* y *Sco7638*

Para la construcción de reemplazos cromosomales en *S. coelicolor* se usó el sistema *Redirect* (Gust *et al.*, 2003), este reemplazo se puede realizar en el marco de lectura correcto del gen deseado por lo que no se esperan efectos polares en la construcción. La estrategia de mutagénesis involucra el reemplazo de una secuencia cromosomal de interés

en un cósmido por un marcador de resistencia. El gen de resistencia a apramicina *acc3(IV)* se obtuvo del plásmido pIJ773 (Gust *et al.*, 2003), se sintetizaron oligonucleótidos de 39 pares de bases flanqueando la secuencia del blanco de interés (Sigma), con estos oligonucleótidos se amplificó el gen *acc3(IV)*. El producto de PCR se introdujo para su recombinación con el cósmido que contiene la secuencia blanco (cósmido10F4 para *Sco7638* y E25 para *Sco3096*) en células transformantes DH5 $\alpha$ \_pIJ790 (Gust *et al.*, 2003). Los cósmidos con el reemplazo de la secuencia blanco por el gen *acc3(IV)* fueron aislados a partir de colonias resistentes a apramicina. Se transformaron células *E. coli* ET12567/pUZ8002 con los cósmidos aislados. Las células transformantes se usaron para introducir los cósmidos aislados a *S. coelicolor* por conjugación. Se seleccionaron y aislaron las dobles recombinantes. La integridad de los reemplazos se comprobó por PCR. Todos los plásmidos y cepas de *E. coli*, empleadas en la construcción de reemplazos cromosomales, fueron provistas por Plant Biosciences Limited.

### **5.3. Ensayos de complementación**

Para el análisis *in vivo* de la actividad promiscua DHQasa de *Sco7638*, *Sco3096* y *Eno* se realizaron ensayos de complementación. Se transformó la cepa *aroD::scar* con los plásmidos pGEX\_*Sco3096*, pGEX\_*Sco7638*, pGEX\_*enocoli*, como control negativo se usó el plásmido “vacío” pGEX 4T-1, y como control positivo se usó el plásmido pGEX\_*aroD*. La cepa *E. coli aroD::scar* y el plásmido pGEX\_*aroD* (control positivo) fueron construidos por Biviana Flores.

Se inoculó con una colonia de transformantes del plásmido de interés un volumen de 3 mL de LB / ampicilina. Los cultivos se incubaron a 37 °C a 300 rpm, hasta una densidad óptica de 0.6, a 600 nm de longitud de onda (OD<sub>600</sub>). A continuación se obtuvo el

paquete celular por centrifugación durante 5 minutos a 4 °C y 4000 rpm. Las células se lavaron con buffer de fosfato 3 veces. Se determinó la densidad óptica OD<sub>600</sub> de las suspensiones celulares. Se realizaron diluciones de las suspensiones celulares para obtener una densidad óptica de 0.1 OD<sub>600</sub>; lo cual corresponde a  $1 \times 10^8$  células / mL. Se realizaron diluciones hasta obtener alrededor de 10 unidades formadoras de colonias (UFC) por  $\mu$ L de solución. Se sembraron alrededor de 500 UFCs por placa. Se empleó un medio M9 suplementado con 100  $\mu$ G / mL de todos los aminoácidos menos triptófano, tirosina y fenilalanina (medio DO-Aro), al que se le agregó 50 pG / mL de shikimato para obtener una concentración final de 287 pM. Como control de crecimiento se sembró la misma cantidad de células en LB / ampicilina, lo cual permitió contar el número UFCs.

#### **5.4. Sistema de selección de variantes con actividad DHQasa**

Para la selección de variantes con actividad DHQasa, la cepa de selección se transformó con la biblioteca mutagénica Aro-Eno por electroporación, las células transformantes se recuperaron durante una hora a 37 °C en un volumen de 1 mL de medio LB, después de este periodo se agregaron 9 mL de LB y ampicilina para una concentración final de 100  $\mu$ G / mL y se incubó por 4 horas a 37 °C. Las células transformantes se lavaron como se describió anteriormente para los ensayos de complementación y se plaquearon  $1 \times 10^5$  células en placas de medio DO-Aro suplementado con 287 pM de SHK, las placas incubaron por 24 horas. Las colonias obtenidas se recuperaron lavando la placa con medio LB estéril; se extrajeron los plásmidos y se repitió el experimento con esta biblioteca seleccionando en medio DO-Aro suplementado con 143.5 pM de SHK.

## **5.5. Expresión heteróloga y ensayos de solubilidad**

Se transformaron células competentes *E. coli* BL21 (Studier *et al.*, 1990), C41, C43 (Miroux *et al.*, 1996), Rosetta y ArticExpress, con los plásmidos pGEX\_*Sco3096*, pGEX\_*Sco7638*, pET15\_*Sco3096*, pET15\_*Sco7638*, pET21\_*Sco7638* y pET21\_*Sco3096*. Se realizaron cultivos de 10 mL de LB / ampicilina a partir de colonias sencillas, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 OD<sub>600</sub>, en ese momento se indujo la sobreexpresión con IPTG a concentraciones de 0.5 y 1 mM. Los cultivos se incubaron a 30, 20 y 17 °C durante 16 horas. Los paquetes celulares se obtuvieron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos y a 4 °C. Los paquetes celulares se resuspendieron en buffer de lisis (Tris HCl 20 mM, pH 7.5) y se lisaron por sonicación en dos ciclos de dos minutos a 50 % de amplitud y dos minutos en hielo. Las fracciones se separaron por centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, las fracciones insolubles se resuspendieron con SDS al 5%.

## **5.6. Solubilización y replegamiento de la proteína en las fracciones insolubles**

Las fracciones insolubles se obtuvieron por centrifugación a 13000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y se resuspendieron en cloruro de guanidina 6 M. Esta solución se dializó por 8 horas contra el buffer de lisis, o bien la solución se goteo lentamente en un volumen 100 veces mayor del buffer de lisis, para finalmente concentrar en tubos Amicon (Millipore) con tamaño de corte de 10 Kda.

## **5.7 Purificación de Sco3096**

La proteína Sco3096 se purificó a partir de cultivos de 1.5 L de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pET15(b)\_*Sco3096*. Los cultivos se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una densidad optica de 0.6 OD<sub>600</sub>, en ese momento fueron inducidos con IPTG a

una concentración de 1 mM. El paquete celular fue obtenido por centrifugación a 4000 rpm durante 30 minutos y 4 °C. El paquete celular se resuspendió en 20 mL de buffer A (20 mM tris, pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol). Las células fueron lisadas por sonicación en dos ciclos de dos minutos a 50 % de amplitud y dos minutos en hielo. La fracción soluble (extracto crudo) se obtuvo por centrifugación a 13000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El extracto crudo se filtró en unidades Millex con poro de 45 micrones (Millipore), y se purificó en una columna cromatográfica de níquel-agarosa (GE Healthcare), empleando un sistema Äkta (GE Healthcare), la proteína se eluyó en un solo paso con el buffer B (20 mM tris, pH 8, 300 mM NaCl , 250 mM imidazol). La fracción colectada se dializó contra el buffer A para eliminar el imidazol. Para obtener proteína pura, se realizó un último paso de cromatografía de exclusión por tamaño molecular en una columna de filtración en gel Superdex 200 (GE Healthcare) con el buffer A.

### **5.8. Ensayo enzimático**

La actividad de enolasa en las fracciones purificadas, fue analizada a través de un ensayo enzimático basado en el consumo de NADH (Sigma), a 340 nm y 25 °C, en una reacción acoplada a piruvato cinasa, (PYK), y lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche) (Poyner *et al.*, 2002). A un mililitro de mezcla de reacción (50 mM HEPES (KOH), pH 7.5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.045 mM NADH, 0.22 mM Na-ADP, 1.38 U / mL LDH, 1.2 U / mL PYK y H<sub>2</sub>O) se agregó enolasa pura, cuya concentración se determinó previamente, finalmente, se midió absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Kari100 (Varian).

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Selección del templado

La búsqueda de enolasas duplicadas en una base de datos de genomas completos, empleando un HMM específico arrojó como resultado la identificación de enolasas parálogas en 31 genomas de bacterias y arqueas (Anexos - Tabla A2). Destacan en este análisis la enolasa codificada en el genoma de *Sulfolobus tokodaii*, un extremófilo con una temperatura óptima de crecimiento de 80 °C y pH óptimo de entre 2 y 3 (Kawarabayashi, 2001). El análisis detallado de la secuencia de esta enolasa permitió identificar todos los residuos involucrados en la catálisis ácido-base, en la estabilización del intermediario, en la unión a metales y en la especificidad por sustrato; a excepción de un cambio en la secuencia de la firma PSGASYG, en la cual se encuentra la serina que cierra el sitio activo, en la que la tirosina que se encuentra altamente conservada es reemplazada por una lisina (PSGASKG), este cambio también se encontró en los extremófilos *Sulfolobus tokodaii* y *Sulfolobus sulfataricus*

Por otra parte, resultan interesantes las enolasas de las bacterias *S. coelicolor*, *S. griseus* y *Lactococcus lactis* debido a que son los únicos casos en los que una de las copias ha sido adquirida aparentemente por transferencia horizontal, como lo sugiere su ubicación en los árboles filogenéticos construidos (Figura 6 y Anexos - Figura 1A). Las enolasas de *S. coelicolor* fueron seleccionadas para el análisis de su contexto genómico debido a la experiencia previa de nuestro grupo en este organismo modelo.

La secuencia de *Sco3096* se encuentra en la región central del cromosoma lineal de *S. coelicolor*, la cual codifica en general para funciones del metabolismo primario. En contraste, *Sco7638* se encuentra ubicado en uno de los brazos del cromosoma, donde hay

gran cantidad de genes adquiridos por transferencia horizontal, y están codificadas muchas funciones del metabolismo secundario (Bentley *et al.*, 2002). Resulta interesante que la región donde se encuentra *Sco7638*, no presenta la sintenia (Figura 6) que observa en el resto de los actinomicetos en el presente análisis. Lo cual refuerza la hipótesis de un evento de transferencia horizontal.

Debido a todo lo anterior y a la disponibilidad del genoma completo, la colección de cósmidos y los sistemas de interrupción de *S. coelicolor*, se seleccionó a *Sco7638* como templado proteico para el experimento de migración funcional, por lo que se procedió a su caracterización.

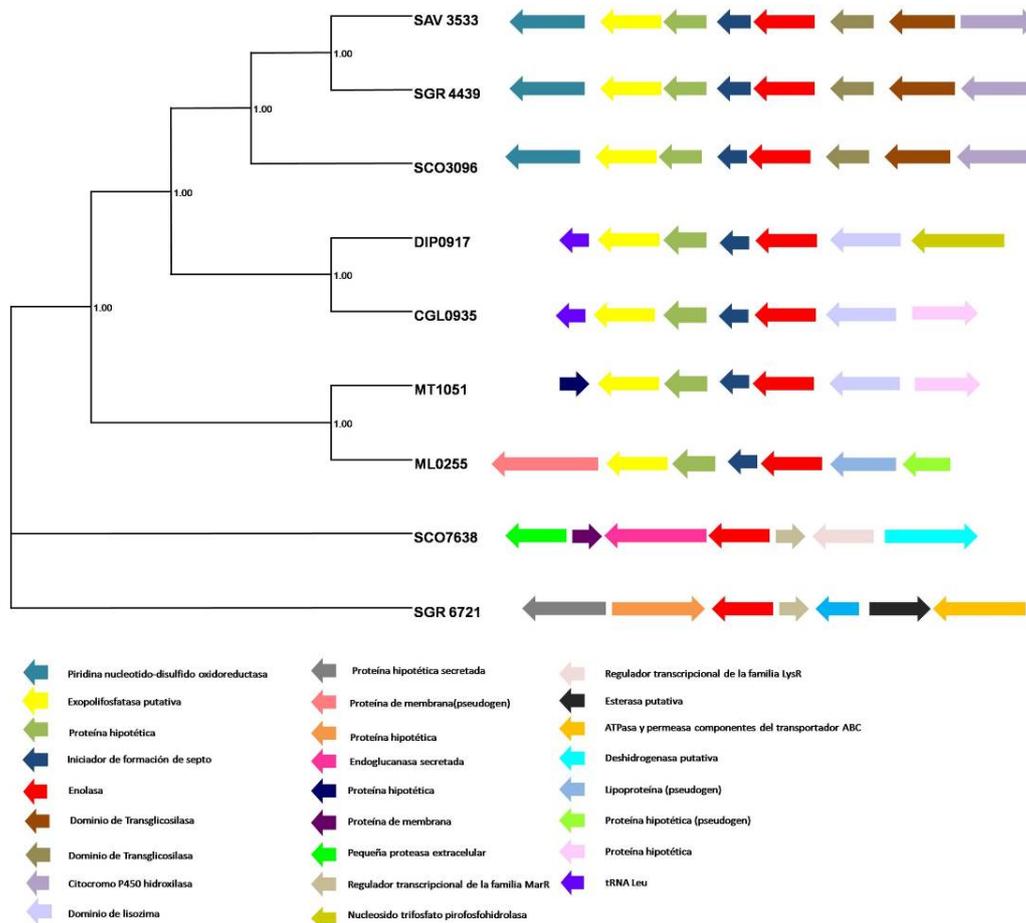
## **6.2. Caracterización funcional *in vivo* de enolasas de *S. coelicolor***

Basados en los argumentos establecidos en la sección 1.5, la deshidratación de DHQ podría ser catalizada promiscuamente por una enolasa xenóloga (*Sco7638*), en un contexto genómico que sugiere la liberación de los compromisos funcionales de una enolasa glicolítica, y que por otra parte, mantiene los residuos necesarios para catalizar el mecanismo de reacción E1cB.

Para la determinación *in vivo* de la presunta actividad DHQasa promiscua, se realizaron ensayos de complementación, evaluando la capacidad de complementar la deficiencia de actividad DHQasa de la cepa de *E. coli aroD::scar*, en medio DO-Aro suplementado con 0, 287 y 143.5 pM de shikimato. Sin embargo no se observó actividad de dehidroquinato deshidratasa *in vivo* en ninguna de las enolasas analizadas en el presente trabajo.

Es posible explicar la carencia de función DHQasa promiscua en la enolasa *Sco7638*, con los argumentos estructurales discutidos en la sección 7. La evaluación de la

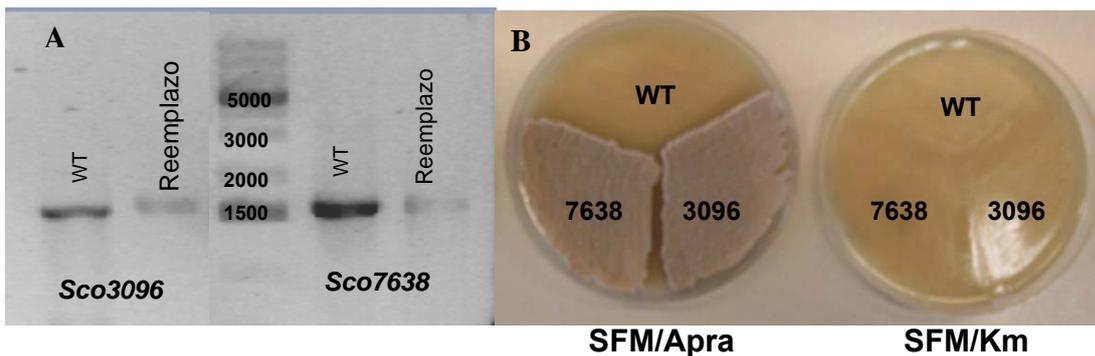
función DHQasa promiscua fue planteada con base en argumentos mecánicos, sin embargo, la liberación de los compromisos glucolíticos de Sco7638, y en consecuencia la posible relajación de su especificidad por sustrato, tal como la hemos planteado en este trabajo no implica que esta proteína se encuentre evolucionando de forma natural para adquirir especificidad por DHQ, inclusive, la diferencia entre ambos sustratos es tal, que el camino evolutivo a recorrer implica la adquisición de mutaciones que probablemente eliminarían la actividad enolasa de Sco7638. Queda por probar si Sco7638 tiene mayor capacidad de evolucionar *in vitro* para la adquisición de especificidad por DHQ.



**Figura 6.** Árbol Filogenético de enolasas de actinomicetos y sus contextos genómicos. *S. griseus* y *S. coelicolor* muestran enolasas divergentes ubicadas en contextos genómicos que no corresponden con la sintenia observada en el resto de los organismos analizados.

## 6.2.2. Mutación de *Sco3096* y *Sco7638*

Para determinar el papel funcional *in vivo* de las dos enolasas de *S. coelicolor* se construyeron reemplazos cromosomales empleando el sistema *Redirect* (Gust *et al.*, 2003). Se confirmó la correcta inserción del gen *acc3(IV)* y la ausencia de los genes blanco por PCR, de este modo se obtuvieron las mutantes de *S. coelicolor*: *Sco7638::acc3(IV)* y *Sco3096::acc3(IV)*. Ambas mutantes crecen en medio harina de soya - manitol (SFM), en presencia de apramicina y son sensibles a kanamicina, (Figura 7). Sabemos a partir de datos de microarreglos y proteómica que *Sco7638* se expresa (Jayapal *et al.*, 2008), y este experimento demostró que la enolasa *Sco7638*, es capaz de suplir la función de *Sco3096* en la mutante *Sco3096::acc3(IV)*. Ante la ausencia de otros parálogos de enolasa en el genoma de *S. coelicolor*, se deduce que la función de *Sco7638* es la de enolasa. Sin embargo, se desconoce si juega algún papel adicional al glicolítico como es el caso de enolasas de otros organismos, y si existen cambios en sus niveles de expresión en las distintas etapas del crecimiento de *S. coelicolor*.



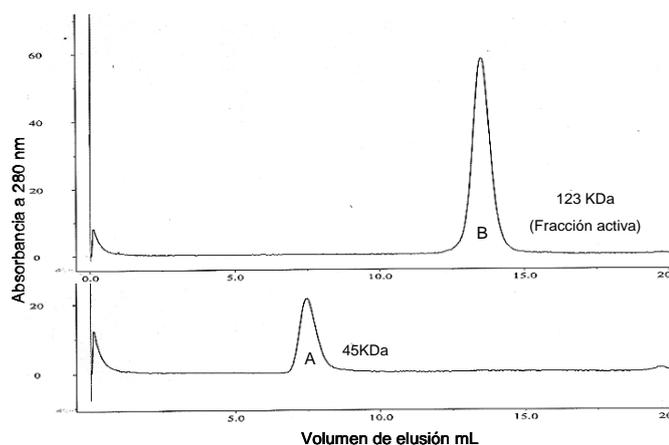
**Figura 7. Reemplazos cromosomales de enolasas en *S.s coelicolor*.** **A.** Gel de agarosa al 1% con productos de PCR para confirmar el reemplazo de las secuencias blanco por el gen *acc3(IV)*, los tamaños esperados de los productos de PCR son 1553 pares de bases para *Sco3096* WT, 1577 para *Sco7638* WT y 1641 para ambos reemplazos. **B.** Después del reemplazo de *Sco7638* y *Sco3096* por el gen de resistencia a apramicina, se aislaron colonias sensibles a kanamicina y resistentes a apramicina. Ambas construcciones crecen en medio harina de soya manitol (SFM) a 30 °C, por 96 horas.

### 6.3. Caracterización *in vitro* de Enolasas de *S. coelicolor*

#### 6.3.1. Expresión y purificación de enolasas Sco7638 y Sco3096

Se obtuvo proteína soluble en las construcciones pET15(b)\_*Sco3096* y pET21(a)\_*Sco3096*, con el mejor rendimiento en la cepa BL21 de *E. coli*, induciendo la expresión con 1 mM / mL de IPTG a una densidad óptica 0.6 OD<sub>600</sub> e incubando a 17 °C durante 16 horas. Debido a la insolubilidad de Sco7638 en los sistemas pGEX y pET21(a), se intentó la solubilización y replegamiento de las fracciones insolubles, sin embargo, no se logró replegar a Sco7638.

Para la determinación *in vitro* de la actividad enolasa de Sco3096, se purificó la proteína por cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño molecular. Se obtuvieron picos correspondientes al 45 KDa (monómero de enolasa) y 123 KDa (Figura 8), las fracciones se observaron como una banda limpia en SDS-PAGE correspondiente a 45 KDa. Sin embargo, fue imposible determinar su concentración, debido a que su espectro de absorción no presenta un pico a 280 nm (datos no mostrados). Por la masa y el espectro de este pico se deduce que la proteína se agrega.



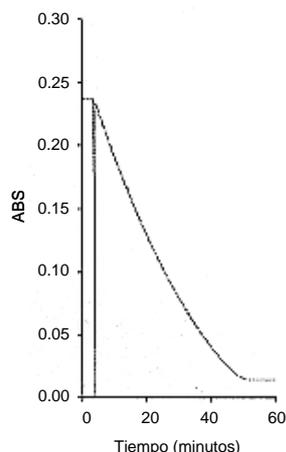
**Figura 8. Fracciones correspondientes al dímery monómero de la enolasa Sco3096.** Los picos correspondientes al (A) dímery (B) monómero de Sco3096 obtenidos se obtuvieron por filtración en gel en una columna analítica Superdex 200 (Amersham).

### 6.3.2. Determinación de la actividad enzimática de Sco3096

La actividad de las fracciones purificadas de Sco3096 fueron analizadas a través de un ensayo enzimático basado en el consumo de NADH (340 nm) en una reacción acoplada a piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa (Poyner *et al.*, 2002). La fracción correspondiente a 123 KDa presentó actividad de deshidratación de 2-PGA (Figura 9). Lo cual demuestra que Sco3096 posee actividad de enolasa. Debido a la agregación de Sco3096 no se pudieron obtener parámetros cinéticos.

La masa correspondiente a la fracción funcional de Sco3096, obtenida por filtración en gel, es de alrededor de 123 Kda, lo cual es una masa intermedia entre el dímero (90 KDa) y el trímero (135 Kda). Se ha demostrado anteriormente que la unidad funcional de las enolasas de procariotas y eucariotas son dímeros (Hannaert *et al.*, 2000). Recientemente se ha resuelto la estructura de la enolasa octamérica de la arquea *Metanococcus janaschii*, esta se trata probablemente de un tetrámero de dímeros (Yamamoto *et al.*, 2008), sin embargo, no se han observado trímeros de enolasa, por lo que creemos que la unidad funcional de la enolasa de Sco3096 es el dímero.

Debido a la insolubilidad de Sco7638, no se pudo realizar un estudio completo de sus características *in vitro*, por lo que se decidió iniciar el trabajo de diseño de especificidad por DHQ en paralelo a la exploración de nueva condiciones de expresión / solubilidad de Sco7638.



**Figura 9. Resultados del ensayo enzimático de la enolasa Sco3096.** Se observa el Consumo de NADH (340 nm) a 25 °C en una reacción acoplada a piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa.

#### 6.4. Rediseño del sitio activo de enolasa de levadura

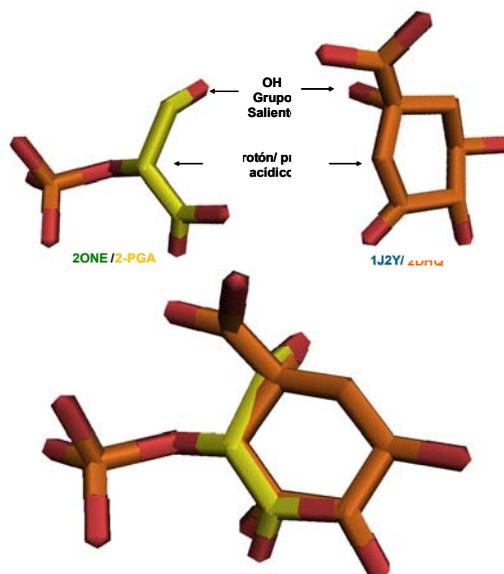
La enolasa Sco7638 fue seleccionada como templatado para el diseño de afinidad por DHQ, sin embargo, no se encontraron condiciones para obtener la proteína en fracciones solubles, por lo que la expectativa de obtener estructuras cristalográficas y cualquier intento de caracterización *in vitro* de esta proteína se vieron interrumpidos. Mientras se encuentran condiciones óptimas para la expresión soluble de Sco7638, se decidió continuar con el diseño de especificidad por DHQ en otra enolasa.

Se seleccionó para la realización del rediseño del sitio activo a *Eno1*, la enolasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, de la cual existen 36 estructuras cristalográficas depositadas en el Protein Data Bank (sin ligandos, en complejo con PEP y 2-PGA, con diversos metales y en diversas conformaciones), adicionalmente los métodos de purificación de enolasa de levadura se encuentran completamente descritos, y se han reportado mutantes en todos los residuos relevantes para el mecanismo de reacción, unión a metales y especificidad de sustrato. Además, el diseño una vez probado en esta enolasa, puede repetirse en Sco7638, una vez que se encuentren condiciones para su expresión

soluble y se profundice su caracterización *in vitro*. A partir de este punto todos los resultados reportados se refieren a la enolasa Eno1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para permitir la unión de Dehidroquinato en el sitio activo de enolasa, se rediseñó su *binding pocket* conservando completamente el módulo catalítico, es decir, los sistemas encargados de la orientación y carga del ácido y base catalíticos. Empleando una superposición funcional (descrita en la sección 5.1), de los sitios activos de 2ONE y 1J2Y se situó DHQ en el sitio activo de enolasa en una posición análoga a la de 2-PGA (Figura 10), con el fin de analizar las interacciones presentes en este complejo, las cuales están resumidas en la Tabla 7 y la Figura 11.

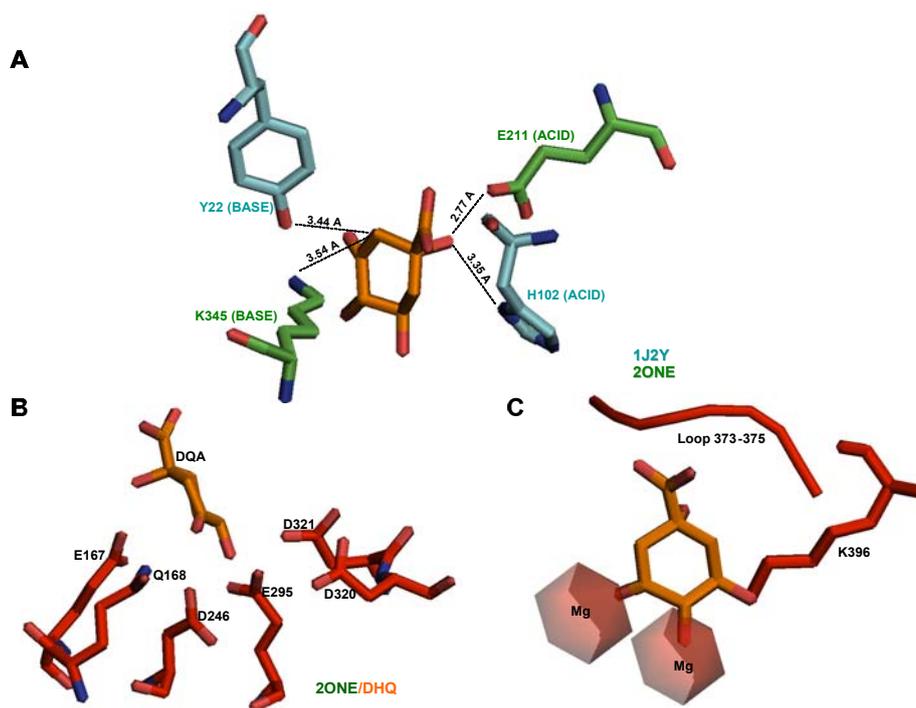
Los residuos en contacto con el sustrato de la enolasa a 6 Å de distancia se definieron como *evolving zone* (Figura 11B). Una segunda esfera de residuos inmediatamente después del *evolving zone* fué definida como *molten zone* (Figura 11A). La identidad de los residuos en la *evolving zone* fue cambiada para crear nuevas interacciones con DHQ, se mantuvo la identidad de los residuos en la *molten zone* y se cambiaron los rotámeros de tal modo que se favorecieron las nuevas interacciones en la *evolving zone*. Se estableció además un grupo compuesto por residuos involucrados en la catálisis (módulo catalítico) como *fixed zone* (Figura 11B), donde los rotámeros e identidades se conservaron (Tabla 10). Todos los residuos en la *evolving zone* fueron reemplazados por alaninas; después de lo cual se cambiaron por las cadenas laterales restantes y sus respectivos rotámeros, una a la vez, manteniendo el resto de las posiciones reducidas a alanina.



**Figura 10. Superimposición de 2-PGA y DHQ.** Superior: características químicas comunes de DHQ y 2-PGA, inferior: superimposición de ambas moléculas.

**Tabla 7. Resumen de las interacciones observadas en el complejo enolasa/DHQ.** El complejo Enolasa/DHQ fue obtenido a través de la superimposición funcional anteriormente descrita. Se encontraron impedimentos estéricos (choques) y cargas no deseadas principalmente.

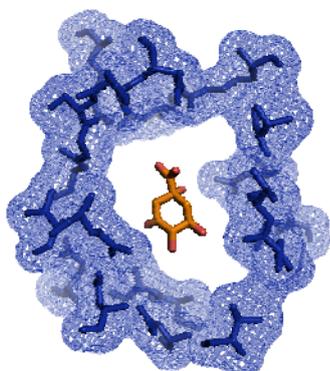
<b>Residuo</b>	<b>Interacción con DHQ</b>	<b>Distancia (Å)</b>
H 159	Interacciones con la base	3.54
Q 167	Carga contraria	2.64
E 168	Carga contraria	2.26
E 211	Protona el OH saliente (Ácido)	2.77
D 246	Unión al Mg <sup>2+</sup>	2.03
E 295	Unión al Mg <sup>2+</sup>	2.18
D 320	Unión al Mg <sup>2+</sup>	2.73
K 345	Abstrae el protón alfa o ácido (Base)	3.54
H 373	Interacciones con la base	3.81
R 374	Interacciones con el ácido	2.74
S 375	Choque	2.3
K 396	Choque	1.17



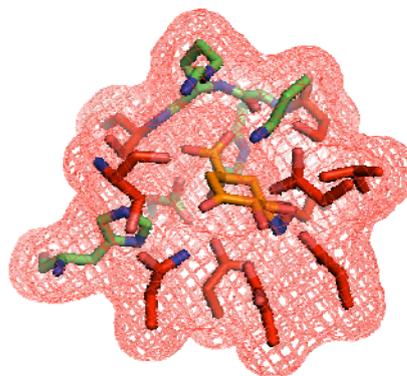
**Figura 11. Análisis de las interacciones en el complejo enolasa/DHQ.** A) Distancias al carbono alfa y al oxígeno del grupo hidroxilo saliente en DHQ de los ácidos y bases catalíticas de DHQasa (azul) y enolasa (verde). A pesar de actuar en ángulos distintos a Y22 y H102 K345 y E211 podrían actuar como ácido y base sobre DHQ. B) abundancia de residuos con cargas no favorables para la unión de DHQ, D246, E295 y D320 forman el módulo de unión a magnesio. C) Impedimentos estéricos observados en el complejo enolasa/DHQ. Los residuos en color rojo son residuos que no favorecen la unión de DHQ en el sitio activo de enolasa.

A través de la búsqueda sistemática de cadenas laterales para el nuevo *binding pocket* en la *evolving zone*, se obtuvieron diseños preliminares que contenían principalmente Gln y Asn. La identidad de estas cadenas laterales se debe a que el sitio activo de enolasa esta optimizado para cadenas de esta longitud (es rico en Glu y Asp); estos diseños no fueron satisfactorios por la longitud de sus cadenas laterales y las cargas que poseen, por lo que se procedió a localizar posiciones en la *molten zone*, equivalente al *second shield*, útiles para colocar cadenas de mayor longitud. Los residuos definidos como *evolving*, *molten* o *fixed zone*, se muestran en la Figura 12 y la Tabla 8.

A



B



**Figura 12. Definición de *evolving*, *molten zone* y *fixed zone*.** A) residuos en la *molten zone*, en el proceso de diseño la identidad de estos se mantiene, mientras que se seleccionan los rotámeros que produzcan interacciones favorables en la *evolving zone*. B) La *evolving zone*, incluye aquellos residuos cuya identidad puede ser modificada para crear interacciones con el ligando, los residuos en color verde son necesarios para la catálisis y se conservaran (*fixed zone*).

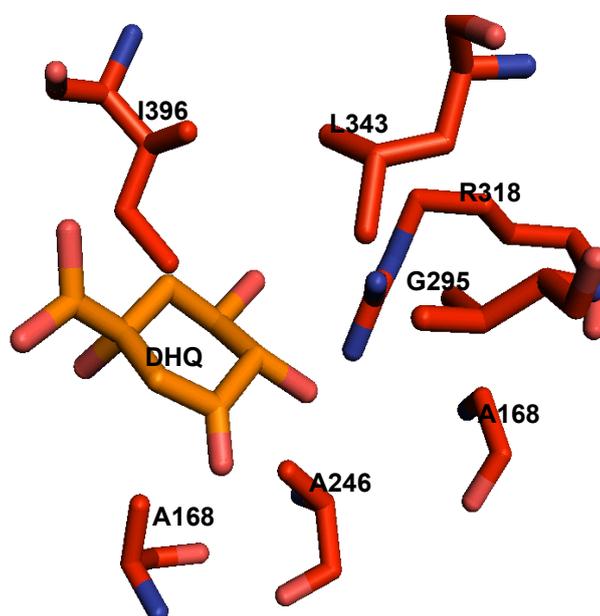
**Tabla 8.** Definición de las posiciones de la *evolving*, *molten* y la *fixed zone* para el proceso de diseño.

<i>FIXED</i>	<i>EVOLVING ZONE</i>	<i>MOLTEN ZONE</i>
H159, E211,	N152, D296, Q167, D320,	S14, N348, V35, P36, S37, G38,
H373, R374,	E168, D321, M170, L343,	L152, S40, E405, F170, S251, G210,
K345	D246, M370, A248, S372,	D247, C248, E296, V318, D321,
	E295, S375, K396	V370, M371, S376, G377, K397

El análisis de estructuras cristalográficas de dehidroquinato deshidratasa tipo I y II (Tablas Anexos - A3 y Anexos - A5) mostró que la unión de DHQ al sitio activo, es principalmente llevada a cabo por una arginina que interactúa con dos hidroxilos de DHQ (Oxígenos O3 y O4), por lo que se buscaron posiciones en el *molten zone*, (ahora reducido también a alaninas) para colocar argininas o lisinas, de este modo se encontraron 3 posiciones, de las cuales el reemplazo Val318Arg permitió obtener el mismo tipo de interacciones observadas en DHQasa tipo II.

Finalmente, el *binding pocket* fue reconstruido fijando la arginina diseñada y reemplazando las alaninas de la *evolving zone* por residuos silvestres. De este modo, se identificaron las interacciones no favorables e impedimentos estéricos. Las posiciones

silvestres en conflicto, ya sea por su carga, o por las interacciones con DHQ o con R318, fueron reemplazadas por cadenas laterales favorables, usando el procedimiento descrito anteriormente. Durante todo el proceso de diseño se empleó dezymer y se compararon los resultados obtenidos por el programa con los diseños realizados. Los reemplazos diseñados para el módulo de unión a DHQ en la enolasa se presentan en la Tabla 9 y Figura 13, en este diseño, las posiciones del modulo catalítico se han conservado, en las posiciones 320, 396, 168 y 343 del modulo de especificidad, existen dos opciones de reemplazo.



**Figura 13. El diseño final del modulo de unión a DHQ.** El diseño está basado en la R318 que interactúa con los hidroxilos 3 y 4 del DHQ; se reemplazaron los residuos del módulo de unión al  $Mg^{2+}$  por cadenas laterales cortas y sin carga.

**Tabla 9.** El diseño final del modulo de unión a DQA basado en R318.

<b>Modulo catalítico</b>	<b>Modulo de especificidad</b>
H159, E211, H373, R374, K345	D246A, E295G, D320V/A, K396I/V, E168A/V, V318R*, L343A/L

\* El diseño final está basado en las interacciones con DHQ predichas para este reemplazo.

## 6.5. Construcción de la biblioteca mutagénica Aro-Eno

Debido a que la solución diseñada puede no ser la combinación óptima y a la posibilidad de reemplazar con más de un aminoácido ciertas posiciones en el modelo generado, se construyó una biblioteca mutagénica dirigida a las posiciones encontradas en el diseño. Para este fin se respetaron las características de los residuos seleccionados durante el proceso de diseño; por ejemplo, residuos de cadena corta, sin carga, fueron seleccionados para las posiciones 320, 396, 168 y 343). De este modo se diseñó la librería Aro-Eno, con 373,248 variantes (Tabla 10).

Los productos de PCR ensamblados (Figura 14 y Tabla 11) fueron clonados en pQE30, obteniéndose una librería de  $10^4$  variantes, por lo que no se exploró completamente el número de combinaciones presente en la biblioteca diseñada. Las clonas muestreadas mostraron la presencia de las mutaciones de acuerdo al diseño, y algunas mutaciones adicionales propias del proceso de ensamble por PCR (Figura 15).

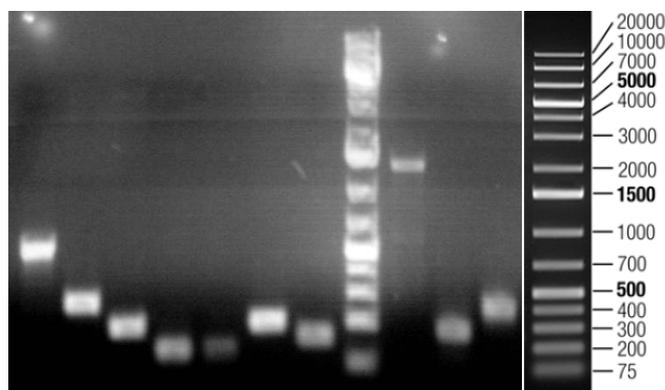
**Tabla 10.** Diseño de la biblioteca Aro-Eno\*.

Residuo	Codon WT	Reemplazo	Codon Mutante			Variantes
D246	GAC	VAG	GBT			3
E295	GAA	VAG	GBT			3
D320	GAT	VAG	G	<u>B=CGT</u>	T	3
K396	AAG	ILV	<u>V=ACG</u>	T	<u>H=ATC</u>	9
E168	GAA	TODOS	N	<u>N</u>	<u>S=CG</u>	32
V318	GTT	NRKS	<u>A</u>	<u>R=AG</u>	<u>N=ATCG</u>	8
L343	TTG	LSMVAT	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	6

\*Las posiciones degeneradas están anotadas en el sistema de una letra. El tamaño de la biblioteca es de 373,248 variantes.

**Tabla 11.** Fragmentos amplificados por PCR para el ensamble de la biblioteca Aro-Eno.

Fragmento	Primer Forward	Primer Reverse	Producto (pares de bases)
1	pQE_eno1_SCE	E168NNS	535
2	E168NNS	D246GBT	273
3	D246GBT	E295GBT	186
4	E295GBT	V318_D320	114
5	V318_D320	L343DYG	114
6	L343DYG	K396VTH	198
7	K396VTH	pQE_eno1_SCE	154
1-2	pQE_eno1_SCE	D246GBT	768
3-4	D246GBT	V318_D320	260
5-6	V318_D320	K396VTH	272
6-7	L343DYG	pQE_eno1_SCE	312
1234	pQE_eno1_SCE	V318_D320	988
567	V318_D320	pQE_eno1_SCE	386
Aro-Eno	pQE_eno1_SCE	pQE_eno1_SCE	1314



**Figura 14.** Fragmentos de PCR para el ensamble de la biblioteca Aro-Eno. Carriles 1 a 7: Fragmentos 1 al 7, carril 8: Marcador de peso molecular 1Kb plus (Fermentas), carril 9: Producto ensamblado Aro-Eno, carril 10: fragmentos 4 y 5, carril 11: fragmentos 6 y 7.

```

Eno1 WT E FMIAPTGAKTFAE ALR IGSEVYH NLKSLTKKRYGASAGNVGDEGGVAPN
AE1 V FMIAPTGAKTFAE ALR IGSEVYH NLKSLTKKRYGASAGNVGDEGGVAPN
AE2 R FMIAPTGAKTFAE ALR IGSEVYH SLKSLTKKRYGASAGNVGDEGGVAPN
AE3 P FMIAPTGAKTFAE ALR IGSEVYH NLKSLTKKRYGASAGNVGDEGGVAPN

Eno1 WT IQTAAEALDLIVDA IKAAGHDGKIK IGLDCASSEFFKDGKYDLDFKHPNS
AE1 IQTAAEALDLIVDA IKAAGHDGKIK IGLGCASSEFFKDGKYDLDFKHPNS
AE2 IQTAAEALDLIVDA IKAAGHDGKIK IGLGCASSEFFKDGKYDLDFKHPNS
AE3 IQTAAEALDLIVDA IKAAGHDGKIK IGLGCASSEFFKDGKYDLDFKHPNS

Eno1 WT DKSKWLTG PQLADLYHSLMKRYP IVSIEDPFAEDDWE AWSHFFKTAGIQI
AE1 DKSKWLTG PQLADLYHSLMKRYP IVS IADPFAEDDWE AWSHFFKTAGIQI
AE2 DKSKWLTG PQLADLYHSLMKRYP IVS IVDPFAEDDWE AWSHFFKTAGIQI
AE3 DKSKWLTG PQLADLYHSLMKRYP IVS IGD PFAEDDWE AWSHFFKTAGIQI

Eno1 WT VADDLTVTNPKR IATAIEKKAADALLLKVHQIGTLSES ICAAQDSFAAGW
AE1 SAADLTVTNPKR IATAIEKKAADTLTKVHQIGTLSES ICAAQDSFAAGW
AE2 NAAVDLTVTNPKR IATAIEKKAADALLLKVHQIGTLSES ICAAQDSFAAGW
AE3 NAAADLTVTNPKR IATAIEKKAADALLLKVHQIGTLSES ICAAQDSFAAGW

Eno1 WT GVMVSHRSGETEDTF IADLVVGLRTGQIKTG
AE1 GVMVSHRSGETEDTF IADLVVGLRTGQIVTG
AE2 GVMVSHRSGETEDTF IADLVVGLRTGQIGTG
AE3 GVMVSHRSGETEDTF IADLVVGLRTGQIFTG

```

**Figura 15. Caracterización de la biblioteca Aro-Eno.** Las secuencias se muestran a partir del residuo 168 hasta el 398, se encontraron mutaciones esperadas en las 7 posiciones diseñadas, además de 2 mutaciones adicionales.

## 6.6. Selección de variantes con actividad DHQasa

Después de una exploración de las condiciones de crecimiento de la cepa de selección transformada con los plásmidos control, se obtuvieron varias “ventanas de selección” (Tabla 12) es decir periodos de tiempo para el aislamiento de variantes con actividad dehidroquinato deshidratasa dependientes de la concentración de shikimato que varió entre 1148 y 0 pM, lo que permitió evaluar las librerías construidas en distintos niveles de presión selectiva. Sin embargo, no se aislaron variantes con actividad DHQasas a partir de las librerías construidas.

Durante el proceso de diseño, se observó que el número de mutaciones requerido para la adquisición de especificidad por DHQ en enolasa es elevado, por lo que se eligió la exploración de múltiples combinaciones de mutaciones para encontrar una solución óptima. La enolasa está especializada en el reconocimiento de los iones  $Mg^{2+}$ , de 2-PGA, y en la estabilización de su fosfato, por lo que posee elementos estructurales indispensables para

ello, esto implica la existencia de muchas interacciones con residuos en la segunda esfera de interacción, y probablemente un elevado número de interacciones remotas difíciles de detectar. Estos elementos estructurales no son necesarios y además son inadecuados para el reconocimiento de DHQ, lo cual hace complicada la adquisición de la nueva especificidad.

**Tabla 12.** Ventana de selección *in vivo* en el medio DO-Aro adicionado con distintas concentraciones de shikimato.

Shikimato	pGEX-4t-1(-)	pQE30 (-)	pGEX_aroD (+)
1148 pM	16 horas	16 horas	16 horas
287 pM	48 horas	48 horas	16 horas
143.5 pM	72 horas	72 horas	16 horas
0	-	-	24 horas

## 7. Conclusiones y perspectivas

En la reacción catalizada por la enolasa, al abstraer el protón alfa unido al C2 de 2-PGA, el grupo fosfato es un excelente grupo saliente; sin embargo, es el hidroxilo el que es liberado para formar agua. En las enolasas se ha seleccionado un sistema de estabilización del fosfato, que como consecuencia desvía el flujo de electrones hacia el hidroxilo unido al C3. Este sistema incluye al magnesio no catalítico de la enolasa, el cual no existe en ningún otro miembro de la superfamilia de las enolasas. La catálisis en las enolasas sucede solo cuando se ha unido el primer magnesio, y 2-PGA ha entrado al sitio activo, se ha unido el segundo magnesio y finalmente un *loop* proveniente del *caping domain* cierra el sitio activo. PEP es un metabolito altamente energético, lo cual hace evidente que es necesario reclutar tal sistema en tanto que es indispensable evitar la salida del grupo fosfato del sustrato durante la reacción.

La hipótesis de que la enolasa Sco7638, ha sido liberada de los compromisos relacionados a su papel glicolítico, y tiene mayor potencial evolutivo que una enolasa glicolítica sigue sin comprobarse. Recientemente se ha observado la existencia de enolasas xenólogas con identidades de secuencia superiores al 84% respecto a Sco7638 en los actinomicetos *Streptomyces lividans* (Barona-Gómez *et al.*, datos no publicados) y *Streptomyces griseus*. El análisis filogenético de estas enolasas, sugiere que el ancestro de estas especies la adquirió por transferencia horizontal de las  $\alpha$ -proteobacterias, su conservación en un grupo de organismos con un extenso metabolismo secundario puede deberse a la necesidad de sintetizar precursores para su producción. El desvío de intermediarios de la glucólisis hacia el metabolismo secundario en este grupo de organismos fue demostrado por Dorrestein *et al.*, (2006), con la caracterización de la

gliceril transferasa / fosfatasa OzmB, que desvía 1,3 bifosfoglicerato hacia la biosíntesis de policétidos.

Sin embargo, las observaciones realizadas en el proceso de rediseño de la especificidad de la enolasa de levadura sugieren que la solución que la naturaleza ha seleccionado en las enolasas para resolver el problema de estabilización del grupo fosfato de 2-PGA, tiene implicaciones mecanísticas, conformacionales y energéticas que no han sido descritas. Como consecuencia, las enolasas presentan una serie de características tales como la carga y longitud de los residuos encargados de la unión del segundo magnesio, el sistema de estabilización del grupo fosfato de 2-PGA, y los cambios conformacionales que suceden durante el ciclo catalítico, Estas probablemente sean la causa del alto grado de conservación observado entre las enolasas de tal modo que el camino evolutivo hacia la especificidad por DHQ requiere de un elevado número de mutaciones, el cual probablemente no fue alcanzado en la biblioteca mutagénica diseñada.

La caracterización *in vivo* e *in vitro* de las enolasas de *S. coelicolor* nos permite concluir lo siguiente:

- (i) Sco3096 posee actividad enolasa *in vitro* y su unidad funcional es un dímero.
- (ii) Sco7638 puede suplir la deficiencia de la enolasa Sco3096 en *S. coelicolor*, por lo que se infiere que posee función de enolasa.
- (iii) Sco7638 no posee actividad DHQasa promiscua.

Este trabajo, nos permitió alcanzar un entendimiento profundo de la química de reacción presente en la superfamilia de las enolasas; sin embargo, para demostrar la autonomía que tienen los mecanismos de reacción sobre los plegamientos proteicos en el

proceso de evolución de nuevas funciones enzimáticas, es necesario replantear los criterios de selección del templado, considerando las restricciones inherentes a los productos y sustratos de las reacciones. Otros miembros de la superfamilia de las enolasas no producen metabolitos de alta energía, y por lo tanto no requieren de sistemas tan complejos para su estabilización como en el caso de las enolasas, mientras que por otro lado emplean la misma química de reacción. Tales consideraciones permitirán que nuestra hipótesis pueda ser retada experimentalmente empleando otros miembros promiscuos de la superfamilia de las enolasas como templado proteico para el diseño de nuevas especificidades.

## 8. Referencias

1. Babbitt PC, Gerlt JA. 1997 **Understanding Enzyme Superfamilies: Chemistry as the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities.** J. Biol. Chem. Vol. 272(49), pp. 30591-30594.
2. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. **Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).** Nature. Vol 417(6885), pp. 141-147.
3. Bershtein S, Segal M, Bekerman R, Tokuriki N, Tawfik DS. 2006. **Robustness-epistasis link shapes the fitness landscape of a randomly drifting protein.** Nature. Vol. 444(7121), pp.929-32
4. Brewer JM, Glover CV, Holland MJ, Lebioda LJ. 2003. **Enzymatic function of loop movement in enolase: preparation and some properties of H159N, H159A, H159F, and N207A enolases.** ProteinChem. Vol 22(4), pp.353-61.
5. Brewer JM, Holland JM, Lebioda L. 2000. **The His159 mutant of Yeast Enolase 1 has significant Activity.** BBRC 276, pp.1199-1202.
6. Chandran V, Luisi BF. 2006. **Recognition of Enolase in the Escherichia coli RNA Degradosome.** J. Mol. Biol 358, pp. 8–15.
7. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. **One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.** Proc Natl Acad Sci U S A. vol 97(12), pp. 6640-5.
8. DeLano, WL. **The PyMOL Molecular Graphics System** (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
9. Des Marais DL, Rausher MD. 2008. **Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene.** Nature. Vol 454, pp.762-766.
10. Dorrestein PC, Van Lanen SG, Li W, Zhao C, Deng Z, Shen B, Kelleher NL. 2006. **The bifunctional glyceryl transferase/phosphatase OzmB belonging to the HAD superfamily that diverts 1,3-bisphosphoglycerate into polyketide biosynthesis.** J Am Chem Soc. 128(32), pp. 10386-7.

11. Eddy SR. 1998. **Profile hidden Markov models.** *Bioinformatics*, Vol. **14**, pp. 755–763.
12. Edgar RC. 2004. **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nuc. Ac. Res.* Vol 32(5), pp. 1792-97.
13. Entelis N, Brandina I, Kamenski P, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov I.1996. **A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genes and Development.* Vol. 20(12), pp. 1609-1620.
14. Gerlt JA, Babbitt PC. 2001. **Divergent evolution of enzymatic function: Mechanistically Diverse Superfamilies and Functionally Distinct Suprafamilies.** *Annu. Rev. Biochem.* 70, pp. 209–46
15. (A) Glasner ME, Gerlt JA., Babbitt PC. 2006 **Evolution of enzyme superfamilies** *Curr. Op. Chem. Biol.* 10, pp. 492–497.
16. (B) Glasner ME, Fayazmanesh N, Ching RA, Ayano S, Jacobson MP, Gerlt JA, Babbitt PC. 2006. **Evolution of structure and function in the *o*- succinylbezoato synthase/N-Acylaminoacid Racemase family of the Enolase superfamily.** *J. Mol. Biol.* 360, pp. 228-250.
17. Gulick AM, Hubbard BK, Gerlt JA, Rayment I. 2001. **Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: identification of the general acid catalyst in the active site of D-glucarate dehydratase from *Escherichia coli*.** *Biochemistry.* 40(34), pp.10054-62
18. Gust B, Kieser T, and Chater K. 2002 **PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2).** *John Innes centre.*
19. Hannaert V, Brinkmann H, Nowitzki U, Lee JA, Albert MA, Sensen CW, Gaasterland T, Müller M, Michels P, Martin W. 2000. **Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway.** *Mol Biol Evol.* Vol. 17(7) pp. 989-1000.
20. Hellinga HW, Richards FM. 1991. **Construction of new ligand binding sites in proteins of known structure Computer-aided modeling of sites with pre-defined geometry.** *J Mol Biol.* Vol. 222(3) pp. 763-85.
21. Horowitz NH. **On the evolution of biochemical syntheses.** 1945. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol 31(6) pp. 153-157.
22. Hughes AL. 1994. **The evolution of functionally novel proteins after gene duplication.** *Proc. R. Soc. Lond. B.* vol. 256.

23. Huelsenbeck, JP, Ronquist F, Nielsen R, y Bollback JP. 2001. **Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology.** Science Vol. 294, pp. 2310-2314.
24. Jäckel C, Kast P, y Hilvert D. 2008. **Protein Design by Directed Evolution.** Annu. Rev. Biophys. 37, pp. 153–73.
25. Jayapal KP, Philp RJ, Kok YJ, Yap MG, Sherman DH, Griffin TJ, Hu WS. 2008. **Uncovering genes with divergent mRNA-protein dynamics in *Streptomyces coelicolor*.** PLoS ONE. Vol 3(5), e2097.
26. Jensen RA. 1976. **Enzyme recruitment in evolution of new function.** ann.rev. microbiol 30, pp. 409-25
27. Jiang L, Althoff EA, Clemente FR, Doyle L, Röthlisberger D, Zanghellini A, Gallaher JL, Betker JL, Tanaka F, Barbas CF 3rd, Hilvert D, Houk KN, Stoddard BL, Baker D. 2008. **De novo computational design of retro-aldol enzymes.** Science. 7;319(5868), pp.1387-91.
28. Kawarabayasi Y, Hino Y, Horikawa H, Jin-no K, Takahashi M, Sekine M, Baba S, Ankai A, Kosugi H, Hosoyama A, Fukui S, Nagai Y, Nishijima K, Otsuka R, Nakazawa H, Takamiya M, Kato Y, Yoshizawa T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Aoki K, Masuda S, Yanagii M, Nishimura M, Yamagishi A, Oshima T, Kikuchi H. 2001. **Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7.** DNA Res. Vol. 8(4), pp. 123-40.
29. Kimura, M y Ohta, T. 1974. **On Some Principles Governing Molecular Evolution.** Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 75, pp. 6168–6171.
30. Kirschner M, Gerhart J., 1998., **Evolvability.**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 95, pp. 8420–8427.
31. Kleeb AC, Edalat MH, Gamper M, Haugstetter J, Giger L, *et al.*, 2007. **Metabolic engineering of a genetic selection system with tunable stringency.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 104, pp. 13907–12.
32. Kraut J. 1977. **Serine proteases: structure and mechanism of catalysis.** Annu Rev Biochem. Vol. 46, pp. 331-58.
33. Kuhlman B, Dantas G, Ireton GC, Varani G, Stoddard BL, Baker D. 2003. **Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy.** Science. Vol 21;302(5649), pp. 1364-8
34. Levy CW, Buckley PA, Sedelnikova S, Kato Y, Asano Y, Rice DW, Baker PJ. 2002. **Insights into enzyme evolution revealed by the structure of methylaspartate ammonia lyase.** Structure. 10(1), pp.105-13.

35. Looger LL, Dwyer MA, Smith JJ, Hellinga HW. 2003. **Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions**. *Nature* Vol. 423, pp. 185.
36. Miroux B. y Walker JE. 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.* Vol. 260, pp. 289–298.
37. McMurry JE, Beagley T. 2005. **The organic chemistry of biological pathways**. Roberts and Company Publishers. Primera edición, pp. 32-34.
38. Nagatani RA, Gonzalez A, Shoichet BK, Brinen LS, Babbitt PC. 2007. **Stability for Function Trade-Offs in the Enolase Superfamily “Catalytic module”**. *Biochemistry* 46, pp.6688–6695
39. O’Boyle NM, Gemma LH, Almonacid DE, Mitchell JBO. 2007. **Using reaction mechanism to measure enzyme similarity**. *J. Mol. Biol.* Vol. 368, pp. 1484-1499.
40. O’Loughlin TL, Patrick WM, Matsumura I. 2007. **Natural history as a predictor of protein Evolvability**. *Prot Eng, Des Sel* vol. 19(10), pp. 439–442.
41. Palmer DR, Garrett JB, Sharma V, Meganathan R, Babbitt PC, Gerlt JA. 1999. **Unexpected divergence of enzyme function and sequence: "N-acylamino acid racemase" is *o*-succinylbenzoate synthase**. *Biochemistry*. Vol. 38(14), pp. 4252-8.
42. Patrick WM, Quandt EM Swartzlander DB, Matsumura I. 2007. **Multicopy Suppression Underpins Metabolic Evolvability**. *Mol. Biol. Evol.* Vol. 24(12), pp. 2716–2722.
43. Patrick WM, Matsumura I. 2008. **A study in molecular contingency: glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase is a promiscuous and evolvable phosphoribosylanthranilate isomerase**. *J. Mol. Biol.* 377(2), pp.323-36.
44. Pegg SC, Brown SD, Ojha S, Seffernick J, Meng EC, Morris JH, Chang PJ, Huang CC, Ferrin TE, Babbitt PC. 2006. **Leveraging enzyme structure-function relationships for functional inference and experimental design: the structure-function linkage database**. *Biochemistry* Vol. 45(8), pp. 2545-55.
45. Peisajovich SG y Tawfik DS. 2007. **Protein engineers turned evolutionists**. *Nature Meth.* Vol. 4(2), pp. 991-994.
46. Piatigorsky J, Wistow GJ. 1989. **Enzyme/crystallins: Gene sharing as an evolutionary strategy**. *Cell*. Volume 57(2), pp. 197-199.
47. Poyner RR, Laughlin LT, Sowa GA, Reed GH. 1996. **Toward identification of acid/base catalysts in the active site of enolase: comparison of the properties of K345A, E168Q, and E211Q variants**. *Biochemistry*. Vol. 35(5), pp. 1692-9.

48. Rakus JF, Fedorov AA, Fedorov EV, Glasner ME, Vick JE, Babbitt PC, Almo SC, Gerlt JA. **Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: D-Mannonate dehydratase from *Novosphingobium aromaticivorans***. *Biochemistry*. 13;46(45), pp.12896-908.
49. Reed GH, Poyner RR, Larsen TM, Wedekind JE, Rayment I. 1996. **Structural and mechanistic studies of enolase**. *Curr. Op. Str. Biol.* Vol. 6, pp. 736-743.
50. Reetz MT, Kahakeaw D, Lohmer R. 2008. **Addressing the Numbers Problem in Directed Evolution**. *ChemBioChem*, Vol. 9, pp. 1797 – 1804.
51. Roszak, AW, Robinson DA, Krell T, Hunter IS, Fredrickson M, Abell C, Coggins J R, Laphorn AJ. 2002. **The Structure and Mechanism of the Type II Dehydroquinase from *Streptomyces coelicolor***. *Structure*, Vol. 10, pp. 493–503.
52. Röthlisberger D, Khersonsky O, Wollacott AM, Jiang L, DeChancie J, Betker J, Gallaher JL, Althoff EA, Zanghellini A, Dym O, Albeck S, Houk KN, Tawfik DS, Baker D. 2008. **Kemp elimination catalysts by computational enzyme design**. *Nature*. Vol. 8; 453(7192), pp.164-6
53. Russell RB, Barton GJ. 1992. **Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels**. *Proteins*. Vol. 14(2), pp. 309-23
54. Sims PA, Larsen TM, Poyner RR, Cleland WW, Reed GH. 2003. **Reverse protonation is the key to general acid-base catalysis in enolase**. *Biochemistry*. Vol. 42(27), pp. 8298-306.
55. Schmidt DMZ, Mundorff EC, Dojka M, Bermudez E, Ness JE, Govindarajan S, Babbitt PC, Minshull J, Gerlt JA. 2003. **Evolutionary Potential of ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-Barrels: Functional Promiscuity Produced by Single Substitutions in the Enolase Superfamily**. *Biochemistry*. Vol. 42(28), pp. 4387- 4393.
56. Schuttelkopf, A.W., and van Aalten, D.M. (2004). **PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes**. *Acta Cryst. D Biol. Cryst.* vol. 60, pp.1355-1363.
57. Song L, Kalyanaraman C, Fedorov AA, Fedorov EV, Glasner ME, Brown S, Imker H0J, Babbitt PC, Almo SC, Jacobson MP, Gerlt JA. 2007. **Prediction and assignment of function for a divergent N-succinyl amino acid racemase**. *Nature Chem. Biol.* Vol. 3(8), pp. 452-3.
58. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff, JW. (1990). **Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes**. *Methods Enzymol.* Vol. 185, pp. 60–89.
59. Tokuriki N, Stricher F, Serrano L, Tawfik DS. 2008. **How Protein Stability and**

**New Functions Trade Off.** PLoS Comput. Biol. 4(2), e1000002.  
doi:10.1371/journal.pcbi.1000002

60. Vick JE, Gerlt JA. 2007. **Evolutionary potential of ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrels: stepwise evolution of a new reaction in the enolase superfamily.** Biochemistry. 46(50), pp.14589-97.
61. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. 2009. **Jalview Version 2 a multiple sequence alignment editor and analysis workbench.** Bioinformatics Advance Access published on, DOI 10.1093/bioinformatics/btp033.
62. Wedekind JE, Poyner RR, Reed GH, Rayment I. 1994. **Chelation of serine 39 to Mg<sup>2+</sup> latches a gate at the active site of enolase: structure of the bis(Mg<sup>2+</sup>) complex of yeast enolase and the intermediate analog phosphonoacetohydroxamate at 2.1-Å resolution.** Biochemistry. Vol. 33(31) pp. 9333-42.
63. White PJ, Young J, Hunter IS, Nimmo HG, Coggins JR. 1990. **The purification and characterization of 3-dehydroquinase from Streptomyces coelicolor.** Biochem. J. Vol. 265, pp. 735-738.
64. Yamamoto H, Kunishima N. 2008. **Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of the putative enolase MJ0232 from the hyperthermophilic archaeon Methanococcus jannaschii.** Acta Cryst. Sect F Struct Biol Cryst Commun. Vol. 64(Pt 11), pp.1087-1090.
65. Yew WS, Fedorov AA, Fedorov EV, Rakus JF, Pierce RW, Almo SC, Gerlt JA, 2006. **Evolution of Enzymatic Activities in the Enolase Superfamily: L-Fuconate Dehydratase from Xanthomonas campestris.** Biochemistry, Vol. 45, pp. 14582-14597.
66. Zanghellini A, Jiang L, Wollacott AM, Cheng G, Meiler J, Althoff EA, Röthlisberger D, Baker D.. 2006. **New algorithms and an in silico benchmark for computational enzyme design.** Prot. Sci. Vol. 15(12), pp.2785-94.
67. Zhang E, Brewer JM, Minor W, Carreira LA, Lebioda L. 1997. **Mechanism of enolase: the crystal structures of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution.** Biochemistry. Vol. 36(41), pp.12526-34.

## 9. Anexos

**Tabla A1.** Superfamilias de enzimas mecanísticamente diversas, clasificadas en el Structure Function Linkage Database (Pegg *et al.*, 2006).

<b>Superfamilia</b>	<b>Atributo mecanístico conservado</b>	<b>Miembros representativos (subgrupo)</b>
Enolasa	Abstracción de un $\alpha$ -protón a un carboxilato para formar un intermediario enolato estabilizado por un ión metálico	Enolasa, Mandelato Racemasa (MR), Muconato Lactonizante (MLE), Glucarato deshidratasa (GlucD), Manonato deshidratasa (ManD) y Metilspartatoamonia liasa (MAL)
Haloácido dehalogenasa	Formación de intermediarios covalentes enzima sustrato por un aspartato	$\beta$ -fosfoglucomutasa, fosfonoacetaldehido hidrolasa, $\text{Cu}^2/\text{H}^+$ -ATPasa
Crotonasa	Uso de un oxianión para estabilizar un anión enolato intermediario derivado de tioesteres.	4-Clorobenzoil-CoA deshalogenasa Metilmalonil-CoA descarboxilasa, ClpP Proteasa
Amidohidrolasa	Hidrólisis asistida por metales	Ureasa, fosfotriesterasa, adenosina deaminasa
Quelación del oxígeno vecinal	Estabilización de intermediarios oxianión formados por catálisis dependiente de metales	Dioxigenasa, Glioxilasa I, Metilmalonil CoA epimerasa
N-acetilneuraminato liasa	Utilización de una base de Schiff protonada como un sumidero de electrones.	N- acetilneuraminato liasa, dihidrodipicolinato sintasa, 2-ceto-3-deoxigluconato aldolasa,
Terpeno ciclasa	Formación de un carbocatión por eliminación de pirofosfato o protonación de un epóxido.	Lanosterol sintasa, taxadieno sintasa, Escualeno-hopeno ciclasa
tDBDF	Transferencia de un hidruro ( $\text{H}^-$ ) entre NAD(P) y FAD.	Glutation- reductasa, NADH ferredoxin reductasa, flavin-Monooxigenasa
Nudix	Hidrólisis asistida por metales.	8-oxo-dGTP pirofosfohidrolasa (mutT) mRNA-5',

**Tabla A2.** Bacterias y arqueas que presentan más de un gen para enolasa, estos daos fueron obtenidos empleando HMM's construidos con secuencias de enolasas colectadas en el SFLD.

<b>Organismo</b>	<b>Copias</b>
<i>Chlorobium tepidum</i> TLS	2
<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	2
<i>Desulfotobacterium hafniense</i> Y51	2
<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	2
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323	2
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	3
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	2
<i>Lactococcus lactis</i>	2
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> DSM 2661	2
<i>Methanococcus aeolicus</i> Nankai-3	2
<i>Methanococcus maripaludis</i> C5	2
<i>Methanococcus vannielii</i> SB	2
<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1	2
<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	3
<i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath	2
<i>Mycobacterium avium</i> 104	2
<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	2
<i>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 8503	2
<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> SI	2
<i>Pseudomonas putida</i> F1	2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	2
<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	2
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	2
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	2
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	2
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	2
<i>Streptomyces lividans</i>	2
<i>Sulfurovum</i> sp. NBC37-1	2
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1	2
<i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2	2
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC BAA-1116	2

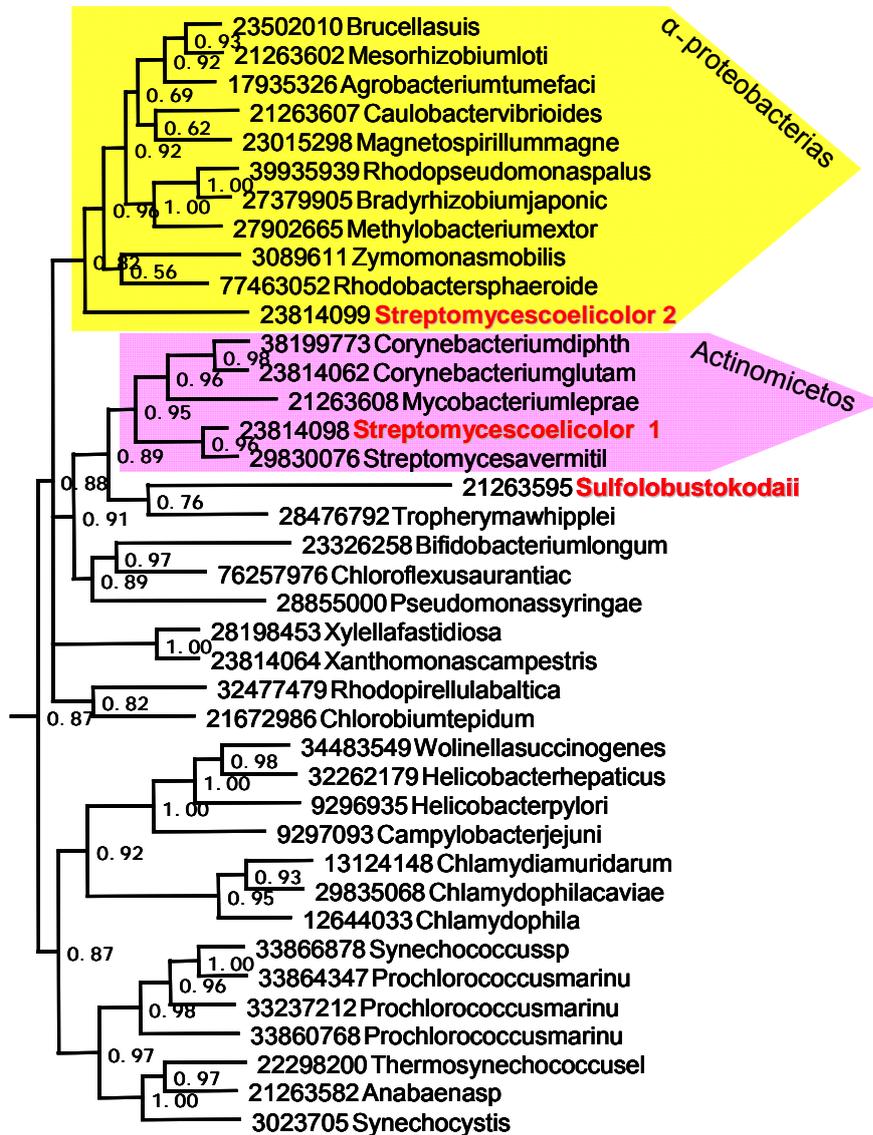


Figura 1A. Leyenda en la página siguiente.

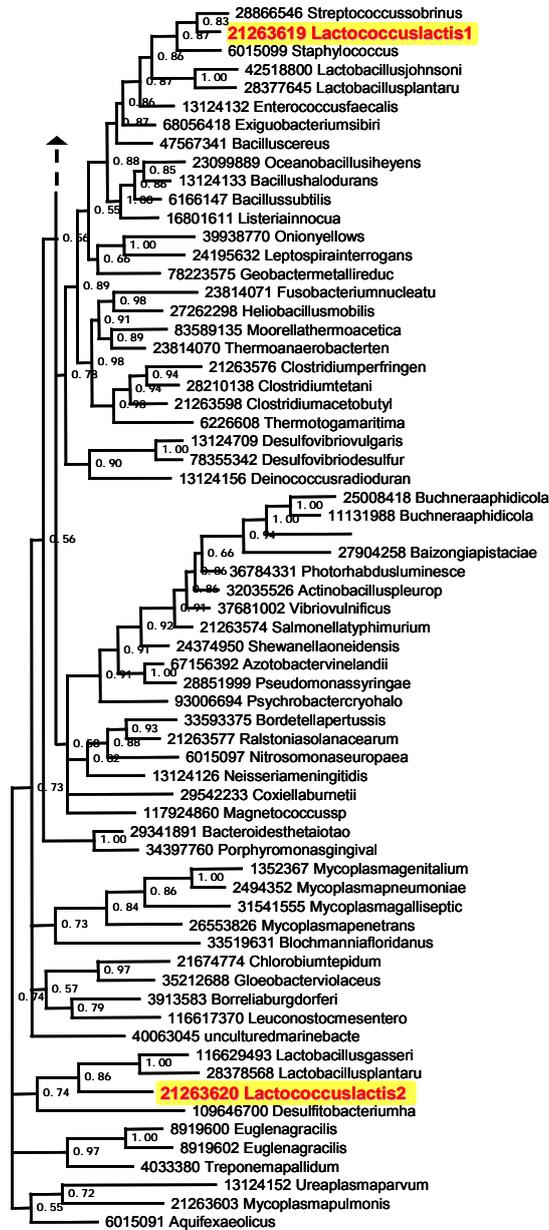


Figura 1A (continuación). Árbol filogenético de enolasas construido con secuencias depuradas del SFLD. Destacan las enolasas de *S. coelicolor* y *Lactococcus lactis* su agrupación en clados distintos sugiere un evento de transferencia horizontal y probablemente divergencia funcional.

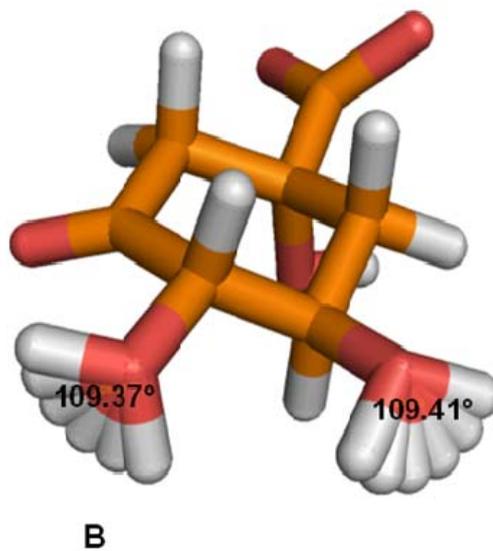
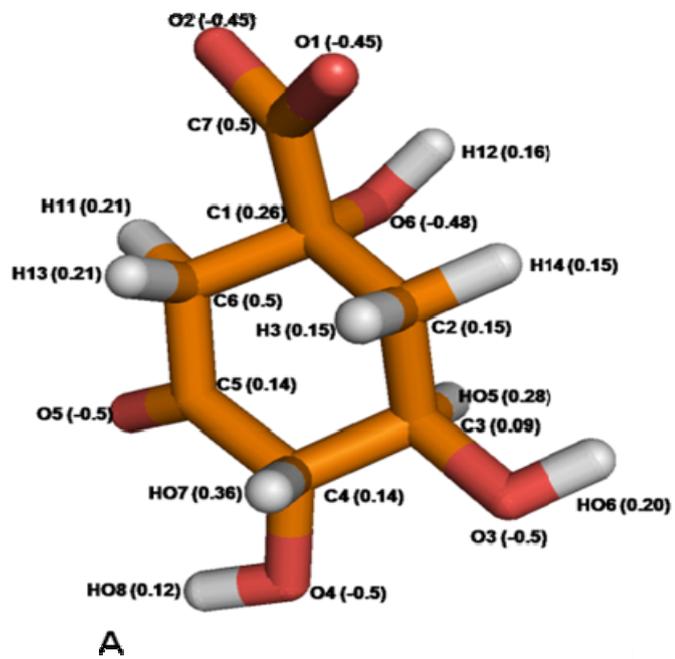
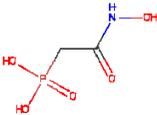
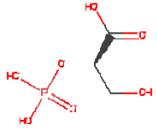
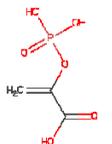
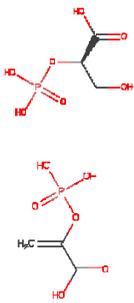
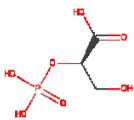
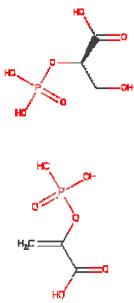
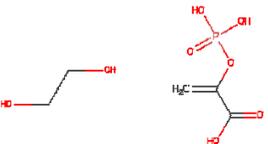
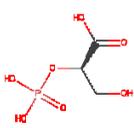
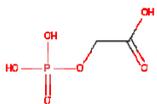
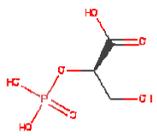


Figura 2A. (A) Asignación de cargas para los átomos de DHQ, (B) Ángulos de torsión incluidos en la librería de ligandos empleada para la búsqueda de interacciones en el complejo 2ONE/DHQ.

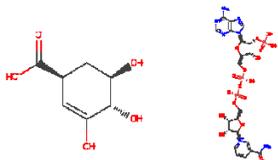
**Tabla A3.** Estructuras cristalográficas de enolasas usadas en la superposición con STAMP.

PDB	Ligando	Estructura del ligando	Organismo	Resolución	Autores	Cadenas	Título
1EBG	PHOSPHONOACET OHYDROXAMIC ACID (PAH), Mg ION		SACCHAROMYCE S CEREVISIAE	2.1	J.E.WEDEKIN D, G.H.REED, I.RAYMENT	4	CHELATION OF SER 39 TO MG2+ LATCHES A GATE AT THE ACTIVE SITE
1ELS	PAH, Mg ION		SACCHAROMYCE S CEREVISIAE	2.4	E.ZHANG, M.HATADA, J.M.BREWER, L.LEBIODA	2	CATALYTIC METAL ION BINDING IN ENOLASE: THE CRYSTAL STRUCTURE
1P43	2- PHOSPHOGLYCER IC ACID (2PG) , Mg ION		SACCHAROMYCE S CEREVISIAE	1.8	P.A.SIMS, T.M.LARSEN, R.R.POYNER, W.W.CLELAN D, G.H.REED	2	REVERSE PROTONATION IS THE KEY TO GENERAL ACID-BASE CATALYSIS
1P48	PHOSPHOENOLPY RUVATE (PEP), Mg ION		SACCHAROMYCE S CEREVISIAE	2	P.A.SIMS, T.M.LARSEN, R.R.POYNER, W.W.CLELAN D, G.H.REED	2	REVERSE PROTONATION IS THE KEY TO GENERAL ACID-BASE CATALYSIS
2AL1	2PG, PEP		SACCHAROMYCE S CEREVISIAE	1.5	P.A.SIMS, A.L.MENEFEE, T.M.LARSEN, S.O.MANSOOR ABADI, G.H.REED	2	CRYSTAL STRUCTURE ANALYSIS OF ENOLASE MG SUBUNIT COMPLEX AT PH
2AL2	2PG, PEP		SACCHAROMYCE S CEREVISIAE	1.85	P.A.SIMS, A.L.MENEFEE, T.M.LARSEN, S.O.MANSOOR ABADI, G.H.REED	2	CRYSTAL STRUCTURE ANALYSIS OF ENOLASE MG SUBUNIT COMPLEX

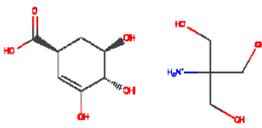
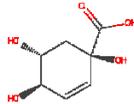
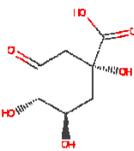
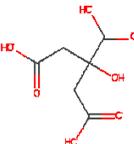
2ONE	2PG, PEP		SACCHAROMYCE S CEREVISIAE	2	L.LEBIODA	8	ASYMMETRIC YEAST ENOLASE DIMER COMPLEXED WITH RESOLVED 2'- PHOSPHOGLYCERATE
2PTY	1,2- ETHANEDIOL (ED O), PEP, Zn		TRYPANOSOMA BRUCEI	2	M.NAVARRO, D.J.RIGDEN, R.C.GARRATT S.M.G.DIAS	2	CRYSTAL STRUCTURE OF THE T. BRUCEI ENOLASE COMPLEXED WITH PEP
5ENL	2PG, Ca ION		SACCHAROMYCE S CEREVISIAE	2.2	L.LEBIODA B.STEC	1	INHIBITION OF ENOLASE: THE CRYSTAL STRUCTURES OF ENOLASE- CA2+- PHOSPHOGLYCERATE
6ENL	2PGA, Zn ION		SACCHAROMYCE S CEREVISIAE	2.2	L.LEBIODA, B.STEC	1	INHIBITION OF ENOLASE: THE CRYSTAL STRUCTURES OF ENOLASE- CA2+- PHOSPHOGLYCERATE
7ENL	2PG, Mg		SACCHAROMYCE S CEREVISIAE	2.2	L.LEBIODA, B.STEC	1	MECHANISM OF ENOLASE: THE CRYSTAL STRUCTURE OF ENOLASE-MG2+- PHOSPHOGLYCERATE(SL ASH)

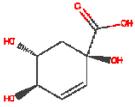
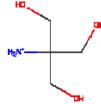
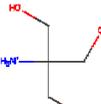
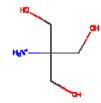
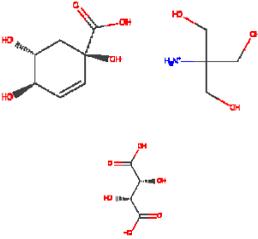
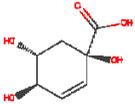
**Tabla A4.** Estructuras cristalográficas de dehidroquinato deshidratatas tipo I usadas en la superposición con STAMP.

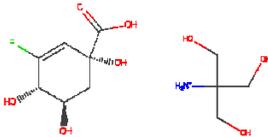
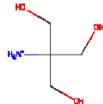
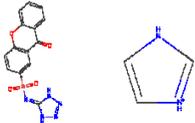
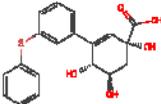
PDB	Ligando	Estructura del ligando	Organismo	Resolución	Autores	Cadenas	Título
1GQN	N.A	N.A	SALMONELLA TYPHI	1.78	W.H.LEE,L.A.PERLES,R.A.P.NAGEM,I.POLIKARPOV,L.SAWYER	1	NATIVE 3-DEHYDROQUINASE FROM SALMONELLA TYPHI
1L9W	(4R,5R)-3-AMINO-4,5-DIHYDROXY-CYCLOHEXENE-1-CARBOXYLATE (DHS)		SALMONELLA TYPHI	2.1	W.H.LEE,L.A.PERLES,R.A.P.NAGEM,A.K.SHRIVE,A.HAWKINS,	1	CRYSTAL STRUCTURE OF 3-DEHYDROQUINASE FROM SALMONELLA TYPHI COMPLEXED
1QFE	DHS		SALMONELLA TYPHI	2.1	A.K.SHRIVE,I.POLIKARPOV,L.SAWYER,J.R.COGGINS,A.R.HAWKINS	4	THE STRUCTURE OF TYPE I 3-DEHYDROQUINATE DEHYDRATASE FROM SALMONELLA
1SFJ	3-DEHYDROSHIKIMATE (DHK)		STAPHYLOCOCCUS AUREUS	2.4	C.E.NICHOLS,M.LOCKYER,A.R.HAWKINS,D.K.STAMMERS	2	2.4A CRYSTAL STRUCTURE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS TYPE I 3-DEHYDROQUINASE,
1SFL	N.A.	N.A	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	1.9	C.E.NICHOLS,M.LOCKYER,A.R.HAWKINS,D.K.STAMMERS	2	1.9A CRYSTAL STRUCTURE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS TYPE I 3-DEHYDROQUINASE,
2GPT	(3R,4S,5R)-3,4,5-TRIHYDROXYCYCLOHEXENE-1-CARBOXYLIC ACID (DKS), TLA, SO4		ARABIDOPSIS THALIANA	1.95	S.A.SINGH,D.CHRISTENDAT	2	CRYSTAL STRUCTURE OF ARABIDOPSIS DEHYDROQUINATE DEHYDRATASE- SHIKIMATE
2O7Q	DHK, SO4		ARABIDOPSIS THALIANA	2.2	D.CHRISTENDAT,S.A.SINGH	1	CRYSTAL STRUCTURE OF THE A. THALIANA DHQ-DEHYDROSHIKIMATE- SDH-SHIKIMATE-NADP(H)

2O7S	DHK, 2'-MONOPHOSPHOADENOSINE 5'-DIPHOSPHORIBOSE (NAP), TLA, SO4		ARABIDOPSIS THALIANA	1.78	D.CHRISTENDAT, S.A.SINGH	1	CRYSTAL STRUCTURE OF THE A. THALIANA DHQ-DEHYDROSHIKIMATE- SDH-SHIKIMATE-NADP(H)
------	---	---	----------------------	------	--------------------------	---	--

**Tabla A5.** Estructuras cristalográficas de Dehidroquinato deshidratasas tipo II usadas en la superposición con STAMP.

pdb	Ligando	Estructura del ligando	Organismo	Resolución	Autores	Cadenas	Título
1GTZ	3- DEHYDRO-SHIKIMATE (DHK), 2-AMINO-2-HYDROXYMETHYL-PROPANE-1,3-DIOL (TRS)		STREPTOMYCES COELICOLOR	1.6	A.W.ROSZAK, T.KRELL, D.ROBINSON, I.HUNTER, J.R.COGGINS,	24	STRUCTURE OF STREPTOMYCES COELICOLOR TYPE II DEHYDROQUINASE R23A
1H05	SULFATE ION (SO4)		MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	1.5	A.W. ROSZAK, J.R OGGINS, A.J. LAPHORN.	12	3-DEHYDROQUINATE DEHYDRATASE FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
1H0S	2,3 -ANHYDRO-QUINIC ACID SO4 SULFATE ION (FA6) GLYCEROL (GOL), SO4.		MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	1.7	A.W.ROSZAK, M. FREDERICKSON, C. ABELL, J.R. COGGINS, A.J. LAPHORN,	1	3-DEHYDROQUINATE DEHYDRATASE FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
1J2Y	1,3,4-TRIHIDROXY-5-OXO-CYCLOHEXAN E CARBOXYLIC ACID (DQA)		HELICOBACTER PYLORI	2.6	B.I.LEE, J.E.KWAK, S.W.SUH	1	3-DEHYDROQUINATE DEHYDRATASE FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
2C4V	CITRIC ACID		HELICOBACTER PYLORI	2.5	D.A.ROBINSON, A.J.LAPHORN	12	CRYSTAL STRUCTURE OF TYPE II DEHYDROQUINATE DEHYDRATASE FROM

2C57	2,3 –ANHYDRO- QUINIC ACID (FA1)		HELICOBACTER PYLORI	3.1	D.A.ROBINSON, A. J.LAPTHORN	1	CRYSTAL STRUCTURE OF TYPE II DEHYDROQUININAE DEHYDRATASE FROM
1UQR	TRS, SO4		ACTINOBACILLU S PLEURO- PNEUMONIAE	1.7	D.MAES L.A. GONZALEZ- RAMIREZ J. LOPEZ- JARAMILLO B.YU,H.DE	2	TYPE II 3- DEHYDROQUINATE DEHYDRATASE (DHQASE) FROM ACTINOBACILLUS
1D0I	TRS, PO4		STREPTOMYCES COELICOLOR	1.8	A.W.ROSZAK, T.KRELL, I.S.HUNTER, J.R.COGGINS A.J.LAPTHORN		CRYSTAL STRUCTURE OF TYPE II DEHYDROQUINASE FROM STREPTOMYCES
1GQO	GOL		BACILLUS SUBTILIS	2.1	D.A.ROBINSON, A.W.ROSZAK, J.R.COGGINS, A.J.LAPTHORN	1	CRYSTAL STRUCTURE OF TYPE II DEHYDROQUINASE FROM STREPTOMYCES
1GU0	TRS		STREPTOMYCES COELICOLOR	2	A.W.ROSZAK, T.KRELL, D.ROBINSON, I.S.HUNTER, J.R.COGGINS,	12	CRYSTAL STRUCTURE OF TYPE II DEHYDROQUINASE FROM STREPTOMYCES
1GU1	FA1, GOL, TRS, L(+)-TARTARIC ACID (TLA)		STREPTOMYCES COELICOLOR	1.8	A.W.ROSZAK, D.A.ROBINSON, T.KRELL, I.S.HUNTER, J.R.COGGINS,	12	CRYSTAL STRUCTURE OF TYPE II DEHYDROQUINASE FROM STREPTOMYCES
1H0R	FA1, Cl ION, GOL, PO4		MYCOBACTERIU M TUBERCULOSIS	2.1	A.W.ROSZAK,D. A.ROBINSON, M. FREDERICKSO N, C.ABELL, J.R.COGGINS,	1	TYPE II DEHYDROQUINASE FROM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEXED

1V1J	2-ANHYDRO-3-FLUORO-QUINIC ACID (FA3), TRS		STREPTOMYCES COELICOLOR	2.2	A.W.ROSZAK J.R.COGGINS, A.J.LAPTHORN	12	CRYSTAL STRUCTURE OF TYPE II DEHYDROQUINTAE DEHYDRATASE FROM
2BT4	TRS, Ca2 ION PO4 ION, GOL		STREPTOMYCES COELICOLOR	1.7	M.D.TOSCANO, K.A.STEWART, J.R.COGGINS A.J.LAPTHORN C.ABELL	12	CRYSTAL STRUCTURE OF TYPE II DEHYDROQUINTAE DEHYDRATASE FROM
2C4W	N-TETRAZOL-5-YL 9-OXO-9H-XANTHENE-2 SULPHONAMIDE (GAJ), IMIDAZOLE GOL		HELICOBACTER PYLORI	1.55	D.A.ROBINSON, A. J.LAPTHORN	1	CRYSTAL STRUCTURE OF TYPE II DEHYDROQUINTAE DEHYDRATASE FROM
2CJF	(1S,4S,5S)-1,4,5-TRIHYDROXY-3-[3-(PHENYLTHIO), TRS 2-AMINO-2-HYDROXYMETHYL-PROPANE-1,3-DIOL (RP4) PO4, TRS, GOL		STREPTOMYCES COELICOLOR	1.95	R.J.PAYNE A.RIBOLDI- TUNNICLIFFE A.D.ABELL A.J.LAPTHORN,	12	CRYSTAL STRUCTURE OF TYPE II DEHYDROQUINTAE DEHYDRATASE FROM