

ARMANDO PROTEÍNAS PLEGADAS CON FRAGMENTOS DE ADN.

L. Segovia, L. Sánchez Sánchez, J. A. Farías Rico, A. Espinosa Cantú y A. Morán García. Departamento de Ingeniería celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología UNAM Apdo. Post. 510-3, 62250 Cuernavaca Morelos .
lorenzo@ibt.unam.mx

La recombinación por genes no homólogos ha tomado gran importancia en los últimos años ya que se ha encontrado evidencia tanto a nivel teórico como experimental que este proceso es una herramienta eficiente de innovación estructural, lo cual da lugar tanto a nuevos plegamientos como a funciones *de novo* en las proteínas. Durante el curso del proceso evolutivo, las proteínas han llegado a quedarse atrapadas en mínimos de energía local. Movimientos dramáticos, como los **swaps** son necesarios para romper o salir de esas regiones y encontrar así nuevos plegamientos que conlleven a nuevas funciones. Sin embargo, estos movimientos bruscos son usualmente deletéreos. En la naturaleza, los mecanismos han evolucionado para incrementar las posibilidades de intercambios exitosos generando así una diversidad de plegamientos que se reflejan en las proteínas que conocemos hoy en día. Justamente la recombinación por genes no homólogos así como otros rearrreglos génicos permiten la transición de un plegamiento a otro y la diversificación de los dominios. Los dominios encontrados en las proteínas son evolutivamente móviles, lo que quiere decir que se han expandido durante el transcurso de la evolución y en la actualidad están presentes en proteínas que no están relacionadas. Estos dominios están frecuentemente involucrados en funciones específicas que contribuyen a la actividad de la proteína completa. Se cree que las proteínas multidominio han surgido por la duplicación y el barajeo por recombinación de los dominios existentes, probablemente las dos fuerzas evolutivas más importantes que dirigen la evolución del proteoma. La duplicación resulta en la expansión de un dominio en términos de su abundancia y ha sido asociada al incremento en la complejidad evolutiva de un organismo; mientras que la recombinación de dominios podría ser el mecanismo más importante por el cual se modifica la función de una proteína dándole versatilidad al proteoma. Estamos tratando de manipular experimentalmente el barajeo de dominios utilizando uno de los modelos más exitosos en la naturaleza, el barril TIM. Se sabe que este es uno de los plegamientos más distribuidos entre distintos tipos de familias enzimáticas. Aproximadamente el 10 % de las enzimas con estructura molecular conocida presentan este plegamiento. Las actividades que desempeñan estas enzimas están comprendidas entre cinco de las seis que hay categorizadas por la Comisión de Clasificación Enzimática: Oxidoreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa e isomerasa. La única de las actividades que no ha sido descrita hasta el momento es la de ligasa. Un barril TIM prototipo está compuesto por 250 aminoácidos, pero su extensión es variable. Hay representantes monoméricas u oligoméricas. Los sitios activos de las proteínas TIM barrel están en los carboxilos terminales de las cadenas β , lo que implica que la geometría de los sitios activos esta determinada por los residuos que

forman los ocho loops que están después de las cadenas beta, (β/α) loops. El loop (α/β) está implicado en mantener la estructura de la proteína.

Hemos diseñado y construido un barril TIM sintético consenso el cual es mas estable. Estamos utilizando ADN total de *E. coli* fragmentado al azar por nebulización o por digestión con DNAsa. Los fragmentos de 100 a 300 pb son purificados y ligados en un vector que contiene un gen modificado de la enzima consenso que carece de un fragmento ($\beta\alpha\beta$) correspondiente a la segunda repetición. Las clonas que son capaces de complementar el plegamiento de esta enzima truncada son seleccionadas utilizando una fusión traduccional con el gen de la Cloranfenicol Acetil Transferasa. Estas clonas confieren resistencia a Cm solo cuando el primer producto está bien plegado. Hemos obtenido un gran número de clonas las cuales hemos estado analizando. Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que no parece haber un tipo particular de enzima que pueda complementar preferentemente este plegamiento, inclusive hemos obtenido clonas que están fuera de fase con respecto a la proteína original. Presentaremos los resultados obtenidos hasta la fecha sobre las caracterizaciones bioinformática y bioquímicas de estas clonas.