



## **REDISEÑO DE PROPIEDADES CATALÍTICAS Y FÍSICO-QUÍMICAS DE ENZIMAS POR MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS**

Lorenzo Segovia, C. Iris Bravo Bonilla, J. Fernando García Guevara. Instituto de Biotecnología, UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Cuernavaca 62210 lorenzo@ibt.unam.

*Ingeniería de proteínas, diseño, bioinformática.*

La biotecnología ofrece diferentes alternativas para generar procesos “verdes”, es decir, ambientalmente amigables. Una de las metas de la biotecnología moderna es diseñar enzimas adecuadas para condiciones particulares. La ingeniería de proteínas es uno de los métodos usados para modificar sus propiedades cinéticas y fisicoquímicas para procesos industrialmente interesantes. Sin embargo, se necesita de mucha información a priori para poder diseñar los cambios requeridos. Una alternativa ha sido el desarrollo de enfoques basados en la evolución dirigida donde por barrido de bancos de mutaciones al azar se seleccionan clonas con las características deseadas, o usando la ingeniería de consensos donde se ha mostrado que una proteína con una secuencia consenso a una familia tiene propiedades de estabilidad y catalíticas incrementadas respecto a las secuencias existentes. En el laboratorio seguimos varios enfoques para modular las propiedades y función de proteínas de interés para diversos procesos biotecnológicos. Los resultados de estos enfoques permiten, al mismo tiempo, obtener información valiosa sobre las propiedades fisicoquímicas y de estructura de las proteínas estudiadas. Recientemente se desarrolló un método estadístico, llamado SCA (1), el cual detecta relaciones entre residuos que covarían en alineamientos múltiples de familias de proteínas homólogas. Estos residuos co-evolucionados están organizados espacialmente dentro de canales físicamente conectados, uniendo sitios distantes funcionales de gran relevancia para el proceso de plegamiento y la actividad de la proteína. Como ejemplo de este enfoque, entre otros, estamos explorando este camino para generar quimeras de proteínas homólogas a la Shikimato deshidrogenasa (SDH). Al estudiar la interrelación que existe entre las posiciones estadísticamente acopladas con la estabilidad y capacidades catalíticas de proteínas consenso, entenderemos mejor cuáles son las posiciones que verdaderamente contribuyen a la estabilización o a la función para el diseño de enzimas con propiedades mejoradas. Estos conocimientos serán de gran utilidad para poder diseñar y construir posteriormente quimeras de novo, inclusive buscando actividades no existentes en la naturaleza. Debido a que en años recientes la cantidad de información de secuencias biológicas ha crecido de una forma extremadamente rápida, el uso de herramientas bioinformáticas para poder analizar esta información se ha vuelto indispensable. Esta información puede ser muy fácilmente usada para generar secuencias consenso, las cuales se ha observado son más estables (2). Diseñamos un dominio Rossmann consenso el cual fusionamos a un dominio catalítico silvestre. Observamos que la proteína consenso era activa al poderse complementar una cepa mutante. La enzima purificada mostró tener constantes catalíticas esencialmente idénticas a la proteína silvestre. No hemos podido determinar su  $T_m$  ya que no es reversible la desnaturalización pero por microcalorimetría hemos observado que hay dos componentes aparentes en la curva que al ser desconvolucionados indican la presencia de un segundo componente de desnaturalización 10 grados mas alto que en la silvestre el cual correspondería a la consenso. Por otro lado hemos utilizado una paquetería llamada Rosetta Enzyme Design (3) para cambiar la especificidad por el cofactor de la SDH de NADP a NAD. Hemos obtenido construcciones las cuales han perdido casi completamente la afinidad por NADP aunque tienen baja afinidad por NAD.

1. Lockless S. W. and Ranganathan R. (1999) Evolutionarily Conserved pathways of Energetic Connectivity in Protein Families. *Science* 286 295-299.
2. Lehmann M, Kostrewa D, Wyss M, Brugger R, D'Arcy A, Pasamontes L, van Loon AP. From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng.* 2000 Jan;13(1):49-57.
3. Kuhlman B, Dantas G, Ireton GC, Varani G, Stoddard BL, Baker D. Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science.* 2003 Nov 21;302(5649):1364-8.