



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**“NUEVOS SISTEMAS BIOCATALÍTICOS PARA LA
FORMACIÓN DE ENLACES C-C.
DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN
SINTÉTICA DE UN ENZIMA DE FUSIÓN
QUINASA-ALDOLASA.”**

Memoria presentada por Dña. **Laura Iturrate Montoya** para optar al grado de
Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de Tesis: Dr. Eduardo García-Junceda Redondo.
Instituto de Química Orgánica General. CSIC

Tutor: Dr. Edgardo Catalán Tobar

Madrid, 2008

TESIS DOCTORAL

El abajo firmante, Dr. D. EDUARDO GARCÍA-JUNCEDA REDONDO, Científico Titular del Departamento de Química Orgánica Biológica del Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICA:

que la presente Memoria titulada “NUEVOS SISTEMAS BIOCATALÍTICOS PARA LA FORMACIÓN DE ENLACES C-C. DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN SINTÉTICA DE UN ENZIMA DE FUSIÓN QUINASA-ALDOLASA” ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica Biológica del Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas por la licenciada en Ciencias Químicas Dña. LAURA ITURRATE MONTOYA y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Madrid a 1 de Marzo de 2008.

Fdo.: Dr. Eduardo García-Junceda Redondo.

El trabajo recogido en esta memoria se ha realizado en el Departamento de Química Orgánica Biológica del Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Dr. Eduardo García-Junceda Redondo. El trabajo ha estado financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia Proyecto *Obtención de nuevos biocatalizadores y desarrollo de rutas de síntesis quimioenzimáticas en fase líquida de carbohidratos con potencial utilidad terapéutica* (CTQ2004-03523/BQU). Dña. Laura Iturrate ha sido financiada por una Beca-Contrato del Programa de Formación del Personal Investigador (FPI) de la Comunidad de Madrid (convocatoria 2003).

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a las siguientes publicaciones o comunicaciones:

Patentes

Patente Nacional: Proteína quimérica aldolasa/quinasa: procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

N. de prioridad: P200701589

País de prioridad: España

Fecha de prioridad: 08-junio-2007

Entidad titular: CSIC

Publicaciones

Iturrate, L., García-Junceda, E. *Aldolase catalysed C-C bond formation in the core of multi-step processes*. In *Multi-Step Enzyme Catalysed Processes* (Ed. García-Junceda, E.) Wiley-VCH. En prensa

Sanchez-Moreno I, Iturrate L, Martin-Hoyos R, Bastida A, Garcia-Junceda E *Biochemical characterization of the recombinant dihydroxyacetone kinase from Citrobacter freundii CECT 4626*. Enviado.

Iturrate, L. Sánchez-Moreno, I. García-Doyagüez, E. Bastida, A. Fernández-Mayoralas, A. García-Junceda, E. *Fusion enzymes in Biotransformations. Preparation and characterization of a bifunctional aldolase/kinase enzyme for stereoselective C-C bond formation*. En preparación

Congresos

Póster: "Obtaining and physico-chemical characterization of a new bifunctional aldolase/kinase enzyme as biocatalyst for stereoselective C-C bond formation".

Julio 2007: Biotrans 2007, 8th International Symposium in Biocatalysis and Biotransformations (Oviedo, España)

Autores: Iturrate L., Sánchez-Moreno I., Bastida A., García-Junceda E.

Póster: "A new bifunctional aldolase/kinase enzyme for stereoselective C-C bond formation".

Sept 2006: VIII National Meeting on Carbohydrate Chemistry (Alcalá de Henares, España)

Autores: Iturrate L., Sánchez-Moreno I., Bastida A., García-Junceda E.

Comunicación oral: "Multienzyme Strategies for Facile and Efficient C-C Bond Formation Catalysed by Dihydroxyacetone Phosphate-dependent Aldolases".

Abril 2006: MECP06, Multi-step Enzyme catalysed Processes (Graz, Austria)

Autores: Sánchez-Moreno I., Iturrate L., García-García JF., Bastida A., García-Junceda E.

Póster: "Caracterización de la Dihidroxiacetona quinasa (DHAK) recombinante de *Citrobacter freundii*: una nueva herramienta para la formación de enlaces C-C catalizada por aldolasas".

Sept 2004: VII National Meeting on Carbohydrate Chemistry (Tarragona, España).

Autores: Sánchez-Moreno, I., Iturrate, L., García-García, J.F., Latorre, M., Bastida, A., Fernández-Mayoralas, A., García-Junceda, E.

Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos.

Aristóteles (384 AC-322 AC)

A Kike.

A mis padres.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Eduardo García-Junceda el haberme abierto las puertas de su grupo de investigación y, principalmente, su disponibilidad durante el periodo de escritura. Varios (por fin) doctores me habían dicho que esta fase era la más dura y, sin embargo, he tenido todas las facilidades del mundo. Al final no ha sido para tanto.

Me gustaría agradecerle a la doctora Ágatha Bastida su supervisión en el día a día. También quiero agradecer a jefes como Alfonso y Juan Luís el haberse interesado por mi trabajo a lo largo de estos años. El Dr. Jesús Pérez-Gil nos ha prestado su consejo, conocimiento y supervisión en los estudios de Dicroísmo Circular descritos en esta Memoria, por ello muchas gracias.

Pero, sobre todo, tengo que darle las gracias a mis compañeros Isra, Montse y Juanfran. Claramente, sin vosotros este trabajo habría sido mucho más duro, por no decir imposible. He aprendido mucho de vosotros: ciencia, cultura general (empleo de verbos en forma compuesta) y mucha convivencia. Es increíble que gente tan diferente pueda trabajar codo con codo, muchas veces en sentido literal, y que no surjan más choques que los físicos por falta de espacio. Me gustaría hacer este comentario extensivo al "vecino" Mario y a todos los compañeros de paso: Ainhoa, Rocío, Fernando, Leyre, Ana y Álex.

También tengo que agradecer a "los chicos del pasillo" todas sus aportaciones en este trabajo, tanto a los que están, como a los que ya se han ido: Elisa (tu ayuda con la resonancia merece una mención especial), Isa, Juan Antonio, Raquel y Félix; Anita, Paco, Igor y Tatiana; Lourdes, Bea, Esther, Ángela, Marieta y David; Samadi, Pablo, Conchi y Rafa; Aitor y Elena y, por supuesto, el resto de vecinos de arriba y abajo: Tania, Miguel Ángel, Nacho, Raúl y Fede. Todos vosotros me habéis enseñado algo y habéis colaborado en hacerme la vida más fácil estos últimos

cuatro años. No puedo olvidarme de Guille, al que sólo le puedo decir que con más gente como tú el mundo sería mejor.

Me gustaría agradecerle también a la gente de Catálisis su apoyo en tiempos difíciles, porque si yo no tiré la toalla antes de empezar, en parte, fue gracias a ellos.

Por supuesto, tengo que agradecer a mi familia su apoyo incondicional: a mi hermano Pablo, por compartir conmigo los primeros experimentos científicos allá por los años 80; a mis padres por apoyar mis decisiones, incluso cuando no las compartíais. Estoy orgullosa de vosotros y comparto la opinión de D. Jesús, no habéis tenido suerte vosotros con Pablo y conmigo, sino nosotros con unos padres como vosotros. Esta memoria me sirve a mí para optar al grado de Doctor, pero el título también es vuestro.

Por último, aunque no menos importante, tengo que agradecerle a Kike... todo. Me ayudaste en su día con los estudios, me animaste cuando la suerte y la salud no me acompañaban, me concediste una "beca González" para la escritura de esta Tesis e incluso has aprendido palabras nuevas como "quinasa, aldolasa, dihidroxiacetona" y muchas más. Es imposible que te diga en dos renglones todo lo bueno que te mereces, así que le dejaré en un simple: "muchas gracias, por todo".

En definitiva, gracias a todos aquellos que, de manera directa o indirecta, habéis colaborado en esta Tesis, con aportaciones científicas, culturales, gastronómicas y afectivas. Gracias por hacer de mí una persona mejor.

Índice

<i>Abreviaturas</i>	5
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN.....	9
Aldolasas	12
Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato.....	15
Estrategias alternativas a la utilización de DHAP.....	18
Síntesis química de DHAP.....	20
Síntesis enzimática de DHAP.....	22
Enzimas de fusión en biotecnología	27
Diseño de una proteína de fusión.....	27
Métodos de obtención de proteínas de fusión.....	30
Aplicaciones biotecnológicas de las proteínas de fusión.....	33
OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Materiales	45
Métodos	47
<u>Metodologías generales</u>	47
<u>Sistema multienzimático acoplado para la formación estereoselectiva</u> <u>de enlaces C-C</u>	49
Obtención de la proteína L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>E. coli</i>	49
Obtención de la proteína L-fuculosa-1-fosfato aldolasa de <i>E. coli</i>	52

Ensayos de actividad.....	53
Síntesis de sustratos no comerciales: L-lactaldehído, L-rhamnulosa-1-fosfato y L-fuculosa-1-fosfato.....	53
Valoración de las actividades L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa y L-fuculosa-1-fosfato aldolasa.....	55
Actividad dihidroxiacetona quinasa.....	55
Ensayos de valoración.....	56
Valoración DHAP/aldol.....	56
Valoración DHAP/DHA.....	57
Sistema multienzimático acoplado para la síntesis de enlaces C-C.....	57
Reacciones en un paso (one-pot/one-step).....	58
Reacciones en dos pasos (one-pot/two-steps).....	59
<u>Enzima de fusión dihidroxiacetona quinasa - fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa.</u>	
Obtención de la proteína fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de <i>Staphylococcus carnosus</i>	59
Obtención de la proteína de fusión quinasa-L-aldolasa (DLF).....	62
Ensayos de actividad.....	65
Dicroísmo circular.....	65
Determinación de parámetros cinéticos.....	66
Estudio del “efecto de proximidad” de los centros activos en el enzima de fusión.....	66
Aplicación sintética del enzima de fusión DLF para la reacción aldólica a partir de DHA y un aldehído.....	67
Determinación estructural mediante Resonancia Magnética Nuclear.....	67
RESULTADOS.....	71
Sistema multienzimático acoplado para la formación estereoselectiva de enlaces C-C.....	73
Estudio de la aplicabilidad sintética del sistema multi-enzimático acoplado para la síntesis de enlaces C-C.....	78
Reacciones en un único paso (one-pot/one-step).....	78
Reacciones en dos pasos (one-pot/two-steps).....	81

Enzima de fusión dihidroxiacetona quinasa – fructosa

1,6-bisfosfato aldolasa	83
Diseño y obtención del enzima bifuncional quinasa-aldolasa.....	84
Diseño del enzima bifuncional quinasa-aldolasa.....	84
Clonaje y sobreexpresión de la FBPA de <i>S. carnosus</i>	88
Clonaje y sobreexpresión de la proteína de fusión.....	89
Caracterización estructural del enzima de fusión.....	92
Estructura primaria.....	92
Estructura secundaria.....	98
Estructura cuaternaria.....	104
Estudio de la estabilidad térmica del enzima de fusión.....	104
Caracterización funcional.....	113
Determinación de parámetros cinéticos.....	113
Estudio del efecto de la fusión en la transferencia de sustrato..	115
Aplicación sintética del enzima de fusión DLF.....	117
Aplicación sintética de la DLF con regeneración in situ de ATP.....	119
DISCUSIÓN.....	123
CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	145

Abreviaturas.

α -GDH	α -glicerofosfato deshidrogenasa
AK	acetato quinasa
ATCC	American Type Cell Culture
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CFE	extracto crudo de proteína soluble
COSY	correlation spectroscopy
DC	dicroísmo circular
DHA	dihidroxiacetona
DHAK	dihidroxiacetona quinasa
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DLF	proteína de fusión quinasa-aldolasa
Fuc1P	L-fuculosa-1-fosfato
Fuc1PA	L-fuculosa-1-fosfato aldolasa
FBP	fructosa-1,6-bisfosfato
FBPA	fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa
G3P	gliceraldehído-3-fosfato
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation experiment
HMQC	heteronuclear multiple-quantum coherence experiment
IMAC	cromatografía de afinidad por iones metálicos
LB	Luria Bertani
NOESY	nuclear Overhauser effect
O/N	durante toda la noche
Rham1P	L-rhamnulosa-1-fosfato
Rham1PA	L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa
TIM	triosafosfato isomerasa

ABSTRACT

The utility of a multienzyme system for C-C bond formation catalysed by dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolases employing aldehydes with great structural diversity as acceptor substrates has been studied. This system was composed by recombinant dihydroxyacetone kinase from *Citrobacter freundii* CECT 4626 for *in situ* dihydroxyacetone phosphate formation, two synthetically useful dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolases —L-fuculose-1-phosphate aldolase and L-rhamnulose-1-phosphate aldolase— and acetate kinase for the ATP regeneration. Two different one-pot strategies were developed in order to adapt the multienzyme system to the reaction conditions showing the great feasibility of the biocatalytic system.

With the aim of simplifying this multienzyme system a new bi-functional fusion protein has been constructed by gene fusion by overlap extension. This fusion enzyme consists of monomeric fructose-1,6-biphosphate aldolase from *Staphylococcus carnosus* and the homodimeric dihydroxyacetone phosphate kinase from *C. freundii* CECT 4626 with an intervening five aminoacids linker. The fusion protein was expressed soluble and retained both kinase and aldolase activity. The secondary structure of the bi-functional enzyme has been analyzed by CD spectroscopy, as well as the parental enzymes, in order to study the effect of the covalent union of the two parents proteins on the structure and thermal stability of the fused enzyme. In addition, the kinetic parameters were studied for both fusion and parent enzymes, showing no effect of fusion on the K_M values while the k_{cat} values were smaller for the fusion protein than those from the parental partners. The k_{cat} value for the kinase activity in the fusion enzyme (3.53×10^2) was about one order of magnitude lower than the k_{cat} of its native equivalent and in the case of the aldolase activity the k_{cat} (1.70×10^3) drop 4 orders of magnitude. Besides this lost in the turnover number, the fusion enzyme maintains a so good catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) about $10^4 \text{ min}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$. The proximity of the active centres in the fusion enzyme promotes a kinetic advantage as indicate the 20-fold increment in the initial velocity of the overall aldol reaction. Finally, the applicability of the fusion enzyme for C-C bond formation using DHA as donor has been tested.

INTRODUCCIÓN

La síntesis orgánica se puede considerar, con sólo una pequeña licencia literaria, como un Meccano que permite construir, a partir de piezas pequeñas y simples, estructuras de una gran complejidad (Fig. 1). En síntesis, los tornillos que mantienen unidas esas piezas son los enlaces C-C, por lo que las reacciones de formación de estos enlaces pueden considerarse —aunque pueda ser discutido— la esencia de la síntesis orgánica (Corey y Cheng, 1989; Li, 2005).

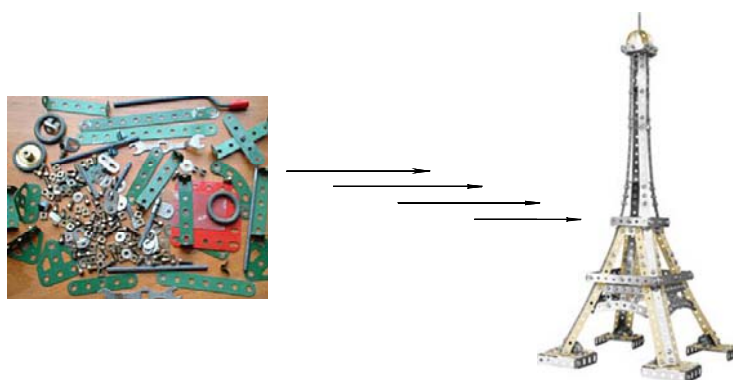


Figura 1. Construcción de una maqueta de la Torre Eiffel a partir de las piezas de un Meccano.

La reacción aldólica es una de las herramientas más utilizadas para la formación de enlaces C-C por los químicos sintéticos y la capacidad de controlar las configuraciones absolutas de los nuevos estereocentros formados permite a los químicos orgánicos diseñar un amplio abanico de compuestos, tanto naturales como no-naturales.

En general, el control de la estereoquímica se ha llevado a cabo diastereoméricamente, bien partiendo de aldehídos quirales o bien utilizando

cantidades estequiométricas de auxiliares quirales unidos al enolato (Mukaiyama, 1982; Evans y Bartoli, 1982; Masamune *et al.*, 1985). Ambas estrategias tienen sus inconvenientes. Mientras que el uso de aldehídos quirales da lugar a adiciones aldólicas de estereoquímica predecible (Lodge y Heathcock, 1987), no es posible la formación de todos los posibles estereoisómeros a partir de un determinado aldehído quiral. Los auxiliares quirales han permitido solucionar este inconveniente, ya que, dependiendo del auxiliar utilizado, es posible obtener todos los estereoisómeros posibles (Evans *et al.*, 1981). Sin embargo, a pesar de los éxitos demostrados por esta aproximación, su principal inconveniente es el aumento de pasos de reacción para introducir y eliminar dicho auxiliar quiral.

Otra posibilidad de control de la estereoquímica de la reacción aldólica la presenta el empleo de catalizadores. Estos métodos catalíticos para la reacción aldólica incluyen la utilización de ácidos de Lewis quirales (Machajewski y Wong, 2000; Palomo *et al.*, 2004), organocatalizadores (Cordoba *et al.*, 2006; Peter y Dalko, 2004; Notz *et al.*, 2004; Seayad y List, 2005) y el empleo de anticuerpos catalíticos (Hanson *et al.*, 2005). Si se trata de imitar a la naturaleza, la aplicación de catalizadores bioquímicos como las aldolasas permite la construcción de carbohidratos con elevado control de la estereoquímica (Machajewski y Wong, 2000).

Aldolasas.

Las aldolasas han despertado el interés de los químicos orgánicos por su capacidad para la formación de enlaces C-C con alto grado de control estereoquímico (Breuer y Hauer, 2003; García-Junceda *et al.*, 2004). Estas enzimas están relacionadas principalmente con el metabolismo de carbohidratos, pero también con el de aminoácidos e hidroxácidos (Fessner y Helaine, 2001).

Existen más de 30 aldolasas identificadas hasta la fecha. Normalmente catalizan la adición aldólica reversible de una cetona donadora a un aldehído

aceptor de manera estereoespecífica (Machajewski y Wong, 2000). Este tipo de enzimas son muy usados en la síntesis de carbohidratos y miméticos de carbohidratos como aza-azúcares o tio-azúcares (Look *et al.*, 1993).

Aunque las aldolasas presentan una estricta especificidad por el sustrato donador, su especificidad por el aldehído aceptor es más laxa, haciendo posible su uso para la formación de más de un tipo de producto. La estereoquímica de la reacción aldólica es altamente predecible, ya que, salvo excepciones, está controlada por el enzima y no por la estructura o la estereoquímica de los sustratos.

Mecanísticamente, las aldolasas pueden dividirse en dos grupos (Fig. 2):

- Aldolasas de tipo I: están presentes en todos los organismos desde procariontas a eucariotas y se caracterizan por la formación de una base de Schiff entre una lisina del centro activo y el carbono carbonílico de la cetona donadora.
- Aldolasas de tipo II: se encuentran solamente en procariontas y levaduras, algas y hongos. Estas enzimas requieren un metal divalente como cofactor, generalmente Zn^{+2} , que actúa como ácido de Lewis activando al nucleófilo.

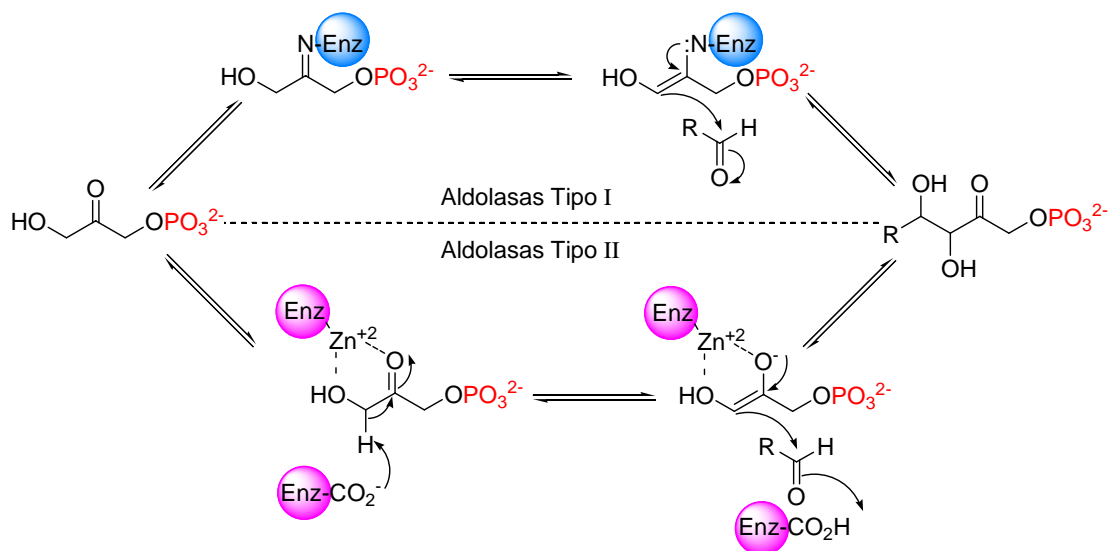


Figura 2. Mecanismo de reacción de las aldolasas.

La identificación del mecanismo de reacción de una aldolasa dada es simple, ya que las aldolasas de tipo I se inactivan irreversiblemente en presencia de borohidruro, por reducción del imonio entre el grupo amino de la lisina y el carbonilo de la cetona donadora a amino. Las aldolasas de tipo II se inactivan reversiblemente en presencia de agentes quelantes, como el EDTA.

Por otro lado, las aldolasas que han sido investigadas desde un punto de vista sintético se pueden clasificar en cuatro grupos en función del sustrato donador y del tipo de producto al que dan lugar (Tabla 1). Estos cuatro grupos principales son:

- las aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato, que dan lugar a la formación de cetosas-1-fosfato.
- Las aldolasas dependientes de piruvato o fosfoenol piruvato, que dan lugar a 3-deoxi-2-cetoácidos.
- Las aldolasas dependientes de acetaldehído, que dan lugar a 3-hidroxialdehídos.
- Las aldolasas dependientes de glicina, que dan lugar a la formación de β -hidroxi- α -aminoácidos.

Tabla 1. Clasificación de las aldolasas en función del sustrato donador.

	Nucleófilo/donador	Aceptor	Producto	Cofactor
DHAP				Clase II: M ⁺²
Glicina				Piridoxal-5'-fosfato
Acetaldehído				
Piruvato o fosfoenolpiruvato				

Dada su amplia aplicabilidad sintética, las aldolasas han sido objeto de múltiples revisiones (Gijzen *et al.*, 1996; Fessner, 1998; Machajewski y Wong, 2000; Seoane, 2000; Sukumaran y Hanefeld, 2005; Samland y Sprenger, 2006). A continuación se desarrollarán únicamente las aldolasas dependientes de DHAP ya que son el objeto de esta Tesis.

Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato.

Las aldolasas dependientes de DHAP dan lugar a cetosas-1-fosfato por reacción aldólica de la DHAP con un aldehído y han sido ampliamente utilizadas en la síntesis de carbohidratos, miméticos de carbohidratos y otros compuestos (Machajewski y Wong, 2000; Fessner y Helaine, 2001). Existen 4 tipos de aldolasas dependientes de DHAP (Fig. 3), que catalizan la adición aldólica de dihidroxiacetona fosfato con D-gliceraldehído-3-fosfato (FBPA y TBPA) o L-lactaldehído (Rham1PA y Fuc1PA) generando 2 nuevos estereocentros. Una ventaja fundamental sobre los catalizadores tradicionales es que la estereoquímica de la reacción se encuentra controlada, salvo excepciones, por el enzima y no por los sustratos (Fessner *et al.*, 1991; Espelt *et al.*, 2003a). Además, estos cuatro enzimas son estereocomplementarios, es decir, su uso permite la síntesis de los cuatro diastereómeros posibles para un par de sustratos dado (García-Junceda *et al.*, 1995). Aunque esta afirmación es de uso generalizado, no es completamente cierta, ya que la tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa no presenta control de la estereoquímica sobre la reacción aldólica en sentido de síntesis cuando se emplean aldehídos distintos al natural (Fessner y Eyrisch, 1992). Sin embargo, esta situación podría llegar a modificarse próximamente ya que se ha demostrado que la estereoquímica del enlace C-C generado por la TBPA puede modificarse mediante evolución dirigida del enzima (Williams *et al.*, 2003).

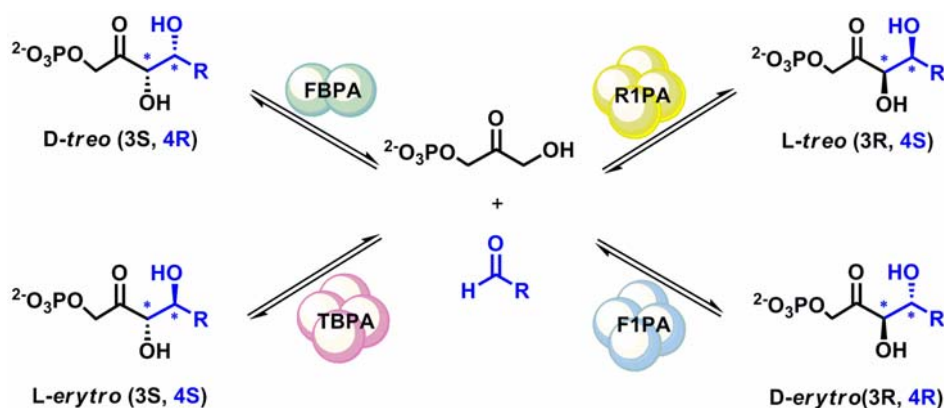


Figura 3. Estereocomplementariedad de las aldolasas dependientes de DHAP.

Las aldolasas dependientes de DHAP toleran un amplio rango de aceptores (Schoevaart *et al.*, 2000a; Fessner y Helaine, 2001), incluyendo aldehídos alifáticos poco impedidos, aldehídos con heteroátomos α -sustituidos (Bednarski *et al.*, 1989), monosacáridos y sus derivados (Bednarski *et al.*, 1986). En general, los aldehídos con impedimentos estéricos, los aromáticos y los α,β -insaturados no se suelen considerar sustratos, aunque existen ejemplos en bibliografía donde aldehídos aromáticos y α -ramificados sí son sustratos del enzima entrecruzado con glutaraldehído (Sobolov *et al.*, 1994).

Una de las principales aplicaciones de estas aldolasas dependientes de DHAP es la síntesis de iminociclitolos (Fig. 4). El interés de estos compuestos radica en que pueden actuar como inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas, con lo que presentan potencial aplicación como antibióticos, fármacos anti-metastásicos, antihiper glucemia o inmunoestimuladores.

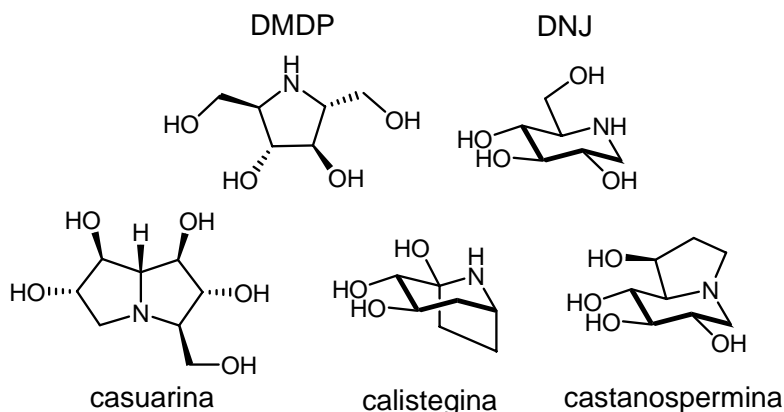


Figura 4. Ejemplos de iminociclitolos naturales.

Existen diversos ejemplos descritos en literatura de rutas quimioenzimáticas con aplicación de aldolasas dependientes de DHAP mediante las cuales es posible acceder a esqueletos iminociclitolos similares a los mostrados en la figura 4. En general, la reacción aldólica utiliza DHAP y un aldehído con un grupo azido en α (Whalen y Wong, 2006) o un aminoaldehído (Espelt *et al.*, 2003b). El aldol fosfato obtenido se trata con fosfatasa ácida y se somete a hidrogenación para llegar al iminociclitol final (Fig. 5).

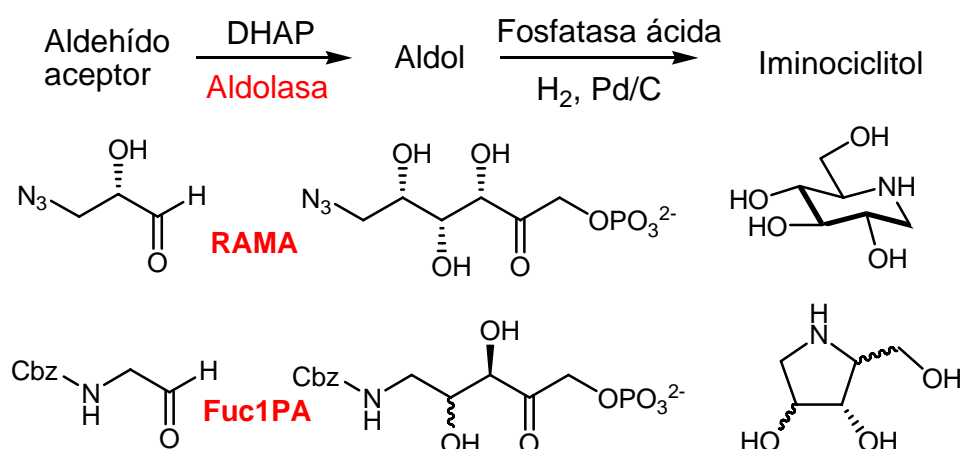


Figura 5. Síntesis quimioenzimática de iminociclitolos catalizada por aldolasas dependientes de DHAP.

La aplicación de aldolasas dependientes de DHAP a la síntesis de productos naturales distintos de carbohidratos es menos habitual. Moléculas complejas como el elicitor microbiano siringólido 2 (Chênevert y Dasser, 2000) o la pancratistatina (Phung *et al.*, 2003) son ejemplos de esta aplicación (Fig. 6). Otros productos naturales que se obtienen incluyendo el uso de una aldolasa dependiente de DHAP en su ruta sintética son la brevicomina (Schultz *et al.*, 1990), la aspíclina (fragmento C3-C9) (Chênevert *et al.*, 1997), la pentamicina (fragmento C11-C16) (Shimagaki *et al.*, 1993) y la anfotericina (fragmento C12-C20) (Malleron y David, 1996).

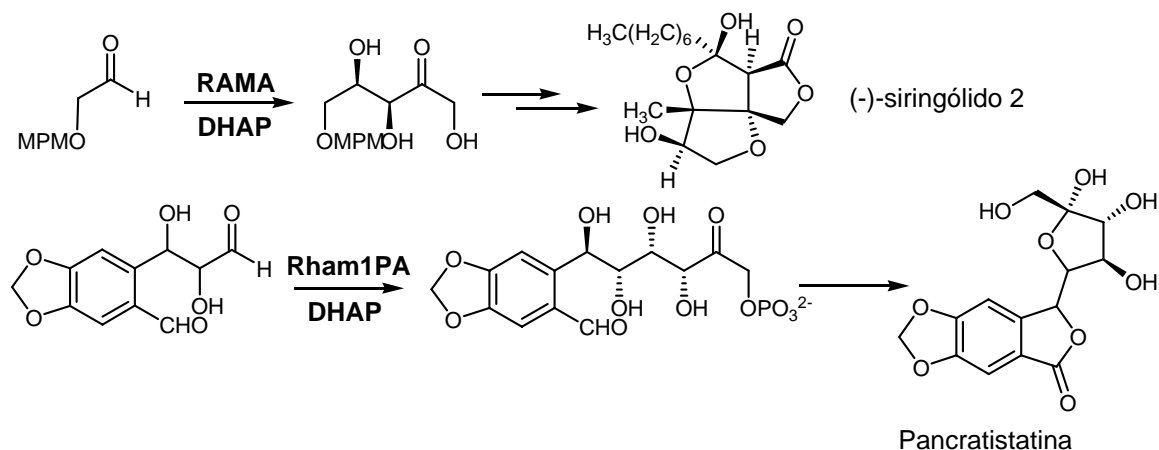


Figura 6. Productos cuya ruta de síntesis requiere la participación de una aldolasa dependiente de DHAP.

El principal inconveniente que presenta el uso de estas enzimas es la disponibilidad de DHAP ya que es un sustrato caro desde el punto de vista comercial y es lábil a pHs neutros y básicos, que es el rango óptimo para las aldolasas. Para intentar superar esta limitación en la aplicación de las aldolasas dependientes de DHAP se han planteado tres tipos de estrategias: (a) evitar el uso de DHAP (b) síntesis química de DHAP; (c) síntesis enzimática de DHAP. Todas estas estrategias han sido recientemente discutidas en profundidad por Panke y colaboradores (Schümperli *et al.*, 2007).

Estrategias alternativas a la utilización de DHAP.

Como alternativa al uso de DHAP, se ha planteado la utilización de arsenatos (Drueckhammer *et al.*, 1989; Schoevaart *et al.*, 2001) y vanadatos (Lagunas y Sols, 1968; Crans *et al.*, 1992) de DHA, formados *in situ*, que actúan como miméticos del éster de fosfato (Fig. 7 A). La aplicabilidad sintética de este tipo de compuestos está limitada por su toxicidad, que elimina la idea de química verde de los procesos enzimáticos, y la posible incompatibilidad redox del vanadato con los componentes del medio de reacción. Más recientemente, Wong y colaboradores han descrito la utilización de borato como mimético del éster de fosfato (Sugiyama *et al.*, 2006). Aunque, por el momento, sólo han demostrado la aplicabilidad del borato-mimético con L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa, su utilización en síntesis de iminociclitolos permite evitar el empleo de

DHAP y simplifica la síntesis eliminando el tratamiento con fosfatasa ácida (Fig. 7 B).

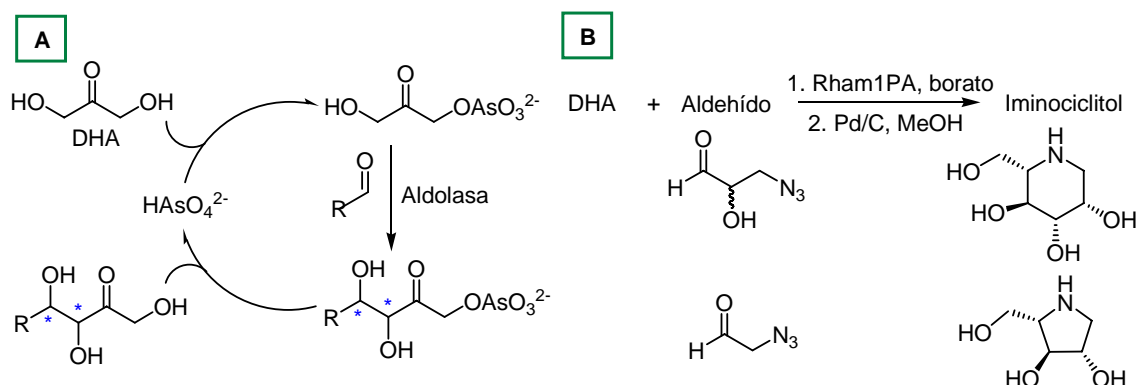


Figura 7. (A) Empleo de arsenatos como miméticos de DHAP; (B) Síntesis de iminociclitos catalizada por Rham1PA en presencia de borato.

Otra vía alternativa al uso de DHAP es el empleo de enzimas que no necesiten DHAP como sustrato donador. Recientemente se ha encontrado una fructosa-6-fosfato aldolasa, una nueva aldolasa tipo I, que cataliza la adición aldólica de DHA a gliceraldehído-3-fosfato (Schürmann y Sprenger, 2001). Además, este enzima tolera otros aceptores no fosforilados generando la misma estereoquímica (3S,4R) que la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (Schürmann *et al.*, 2002). Aunque, de momento, sólo se ha encontrado esta estereoquímica dentro de un posible grupo de aldolasas dependientes de DHA, este enzima ha demostrado su aplicabilidad en síntesis de compuestos como la D-fagomina (Castillo *et al.*, 2006) y otros iminociclitos (Sugiyama *et al.*, 2007b) (Fig. 8).

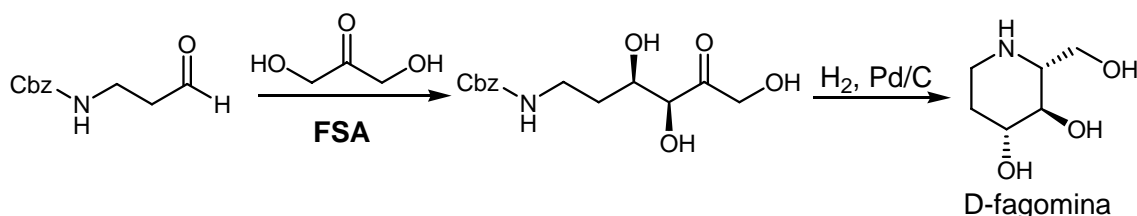


Figura 8. Aplicabilidad de la fructosa-6-fosfato aldolasa en la síntesis de D-fagomina.

Como vía de obtención de otros enzimas que no necesiten DHAP como sustrato donador se pueden aplicar estrategias de evolución dirigida que permitan modificar la especificidad de sustrato de las aldolasas dependientes

de DHAP (Sugiyama *et al.*, 2007a) aunque de momento los datos existentes sólo se pueden considerar como preliminares.

Síntesis química de DHAP.

Debido a las distintas funcionalidades presentes en la DHAP, la mayor parte de sus rutas de síntesis química suelen ser procesos que incluyen diversos pasos de protección/desprotección, suelen tener costes elevados y utilizan reactivos tóxicos en muchos casos, lo que limita su aplicación. En general, las rutas sintéticas de DHAP se pueden agrupar en tres bloques en función del precursor de DHAP hacia el que se dirigen: el dímero cíclico DDDP₂ (2,5-dietoxi-*p*-dioxan-2,5-dimetanol-*o*-2¹-*o*-5¹-bisfosfato), una serie de acetales fosforilados monoméricos o la dibencil-3-bencilhidroxiacetona fosfato.

Existen distintas rutas descritas en bibliografía para la síntesis del precursor DDDP₂ (Colbran *et al.*, 1967; Effenberg y Straub, 1987; Pederson *et al.*, 1991; Jung *et al.*, 1994). Todas ellas llegan al precursor con rendimientos entre 32-74%. Además, su posterior hidrólisis térmica o por acidificación para la obtención final de DHAP tiene rendimientos moderados, de hasta un 66% (Fig. 9).

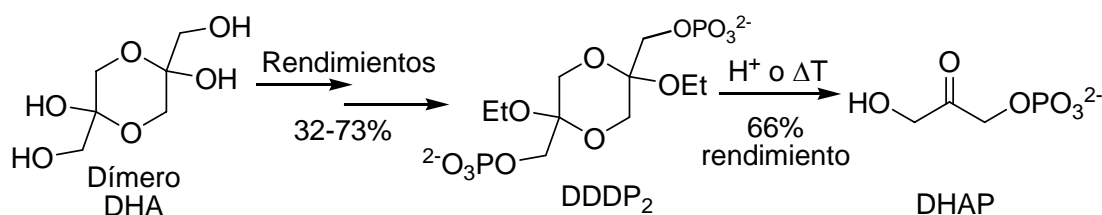


Figura 9. Síntesis química de DHAP a través del precursor DDDP₂.

Los acetales fosforilados monoméricos se pueden obtener en varios pasos a partir de 3-cloro-1,2-propanodiol (Ballou y Fischer, 1956), acetona (Valentin y Bolte, 1995; Gefflaut *et al.*, 1997), o el dímero de dihidroxiacetona (Ferroni *et al.*, 1999; Charmantray, 2004). En estos casos, el rendimiento global de la obtención del precursor es pobre, entre el 13 y el 48%. Como en el caso anterior, la obtención de la DHAP final se consigue por hidrólisis ácida o básica,

según el precursor. En este caso, el paso final de hidrólisis tiene rendimientos entre buenos y excelentes (73-95%) (Fig. 10).

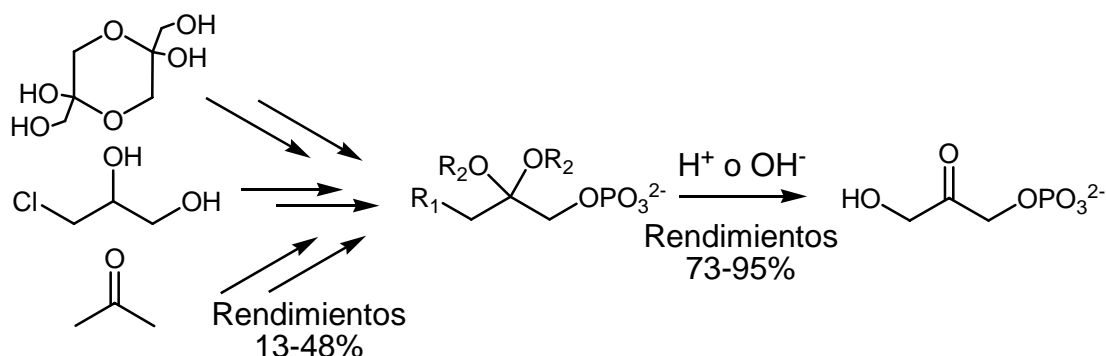


Figura 10. Síntesis química de DHAP a través de acetales fosforilados.

Recientemente se ha descrito una ruta sintética de dibencil-3-bencilhidroxiacetona fosfato a partir de bencilglicidol racémico (Meyer *et al.*, 2006). El interés de esta ruta radica en que es una síntesis en escala de gramos, el reactivo de partida es barato y, además, el precursor de DHAP es estable y se obtiene con un rendimiento global del 74%. Además, la DHAP se puede obtener por hidrogenolisis de manera cuantitativa. Sin embargo, este método requiere cantidades estequiométricas de ácido de Lewis (CuI, NMO), que es difícil de preparar, utiliza como catalizador TPAP, que es muy caro y, además, el bencilglicidol de partida no es comercial (Fig. 11).

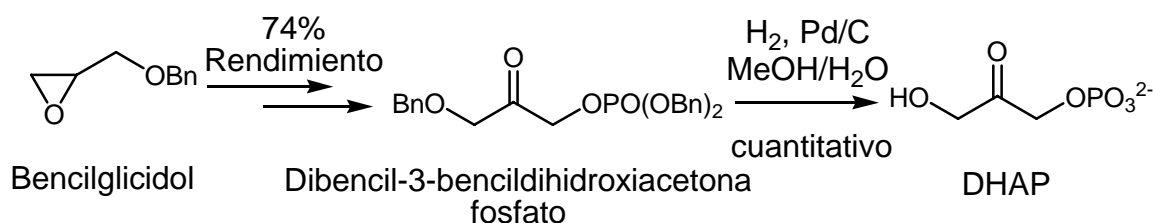


Figura 11. Síntesis química de DHAP a través de dibencil-3-bencilhidroxiacetona fosfato.

De manera global, aunque se ha demostrado que estas rutas dan lugar a preparaciones de DHAP directamente aplicables a las reacciones con las aldolasas, todas ellas son rutas en varios pasos, con rendimientos globales relativamente bajos, con distintos pasos de purificación y que además necesitan utilizar reactivos caros y/o tóxicos.

Síntesis enzimática de DHAP.

Existen descritos varios métodos de síntesis enzimática de DHAP que buscan solucionar los problemas que presenta su síntesis química. Todas ellas buscan una estrategia one-pot, lo que implica la eliminación de los pasos de purificación y además, se aplican a la generación *in situ* de la DHAP, lo que permite solucionar el problema de la estabilidad.

La DHAP se puede preparar por oxidación del L-glicerol-3-fosfato (L-G3P) catalizada por la glicerofosfato oxidasa (GPO). Esta reacción tiene lugar con consumo de oxígeno y generación de peróxido de hidrógeno. Para evitar su acumulación es necesario añadir catalasa, que regenera el oxígeno consumido (Fig. 12) (Fessner y Sinerius, 1994). Se han investigado varias L-GPO de distintos microorganismos, pero todas ellas presentan inhibición por producto a altas concentraciones. Además, las condiciones oxidantes pueden favorecer la formación de polímeros de DHAP. Para evitar este inconveniente, Fessner y Sinerius (1994) acoplaron la oxidación del L-glicerol-3-fosfato a la reacción aldólica catalizada por fructosa-1,6-bisfosfato de músculo de conejo y por L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *E. coli*. El principal problema que plantea el acoplamiento de este sistema de generación de DHAP con la reacción aldólica radica en la estabilidad del aldehído. Las condiciones del medio de reacción son altamente oxidantes y en estas condiciones el aldehído puede oxidarse a ácido.

A esta ruta se ha acoplado un paso previo de formación *in situ* de D,L-G3P por fosforilación de glicerol catalizada por una fitasa (Schoevaart *et al.*, 2000b). El punto clave de esta ruta es la utilización de la fosfatasa fitasa de *Aspergillus ficuum*, que es un enzima barato y accesible que tiene la característica de ser activa a pHs ácidos y ser inactiva a pH neutros. Así, es posible llevar a cabo la reacción multienzimática completa mediante modulación de la actividad fosforilasa con el pH (Fig. 12- ruta A).

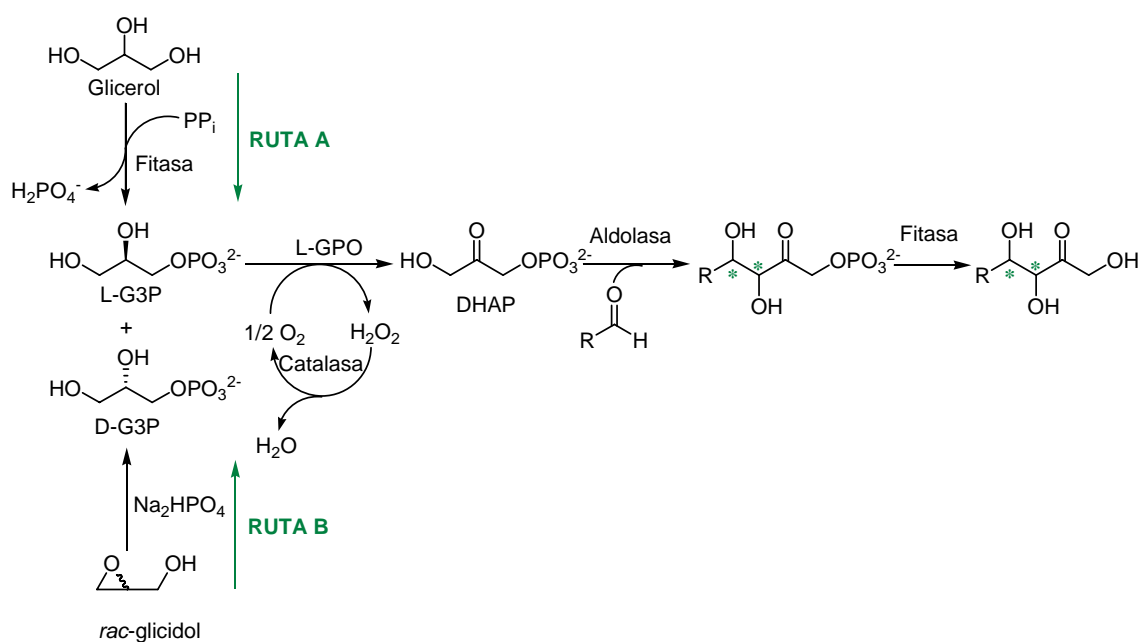


Figura 12. Rutas enzimáticas de síntesis de DHAP basadas en el empleo de glicerolfosfato oxidasa (GPO) acoplado a la reacción aldólica y a la posterior desfosforilación del aducto formado.

Más recientemente, el sistema desarrollado por Fessner y Sinerius ha sido acoplado a la formación *in situ* de D,L-G3P por apertura química del anillo epóxido del *rac*-glicidol con fosfato (Charmantray *et al.*, 2006) (Fig. 12- ruta B).

Por otra parte, Wever y colaboradores (van Herk *et al.*, 2006) han descrito una reacción en cascada para la formación *in situ* de DHAP utilizando la fosfatasa ácida de *Shigella flexneri* (PhoN-Sf) y pirofosfato inorgánico (PP_i) como donador de fosfato (Fig. 13).

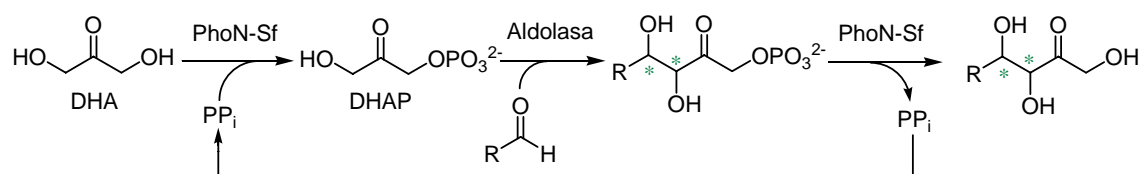


Figura 13. Sistema multienzimático para la obtención de aldoles con formación *in situ* de DHAP a partir de DHA y PP_i y con reciclado de fosfato.

Este sistema tiene la peculiaridad de aprovechar la reversibilidad de la fosfatasa para el reciclado del grupo fosfato. Así, la fosfatasa empieza

catalizando la fosforilación de la DHA y a continuación desfosforila el aldol fosfato formado en la reacción aldólica. El principal inconveniente que presenta este método, como los propios autores reconocen, es que necesita partir de grandes cantidades de DHA y PP_i que se mantienen al final de la reacción dificultando el proceso de purificación del producto.

Otra herramienta empleada para la obtención enzimática de DHAP es la aplicación de enzimas quinasas. En general, estos métodos requieren la transferencia de un grupo fosfato, normalmente de ATP, al precursor no fosforilado (Fig. 14).

Debido al elevado coste del ATP y a que el ADP formado suele actuar como inhibidor de las quinasas, la formación de DHAP suele llevar acoplado un sistema de regeneración de ATP. Los sistemas de regeneración más importantes son (Crans *et al.*, 1987): (i) la regeneración de ATP a partir de acetilfosfato mediante una acetil quinasa y (ii) la regeneración a partir de fosfoenolpiruvato mediante una piruvato quinasa. Menos explorado y explotado sintéticamente es el sistema de regeneración a partir de polifosfato inorgánico mediante una polifosfato quinasa (Murata *et al.*, 1988; Noguchi y Shiba, 1998). La principal ventaja de la utilización del acetilfosfato es que es fácil de preparar (Crans y Whitesides, 1983), aunque su hidrólisis es relativamente rápida. Por su parte, el fosfoenol piruvato es estable pero su síntesis es cara y tediosa, además, el piruvato generado es un inhibidor competitivo de quinasas, lo que limita su aplicación (Hirschbein *et al.*, 1982). La utilización de la polifosfato quinasa en la regeneración de ATP está limitada por la capacidad de esta enzima para fosforilar nucleósidos bisfosfato, que ronda el 50% en el caso del ADP (Noguchi y Shiba, 1998).

Para poder simplificar la aplicación de las aldolasas dependientes de DHAP, estos sistemas de regeneración de ATP se deben acoplar a la síntesis de DHAP y a la reacción aldólica siempre que sea posible.

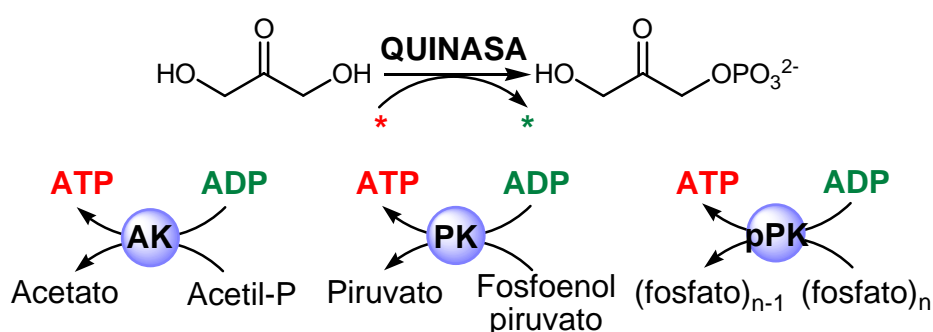


Figura 14. Fosforilación de DHA catalizada por quinasa con consumo de ATP. Sistemas de regeneración de ATP. (AK: acetato quinasa; PK: piruvato quinasa; pPK: polifosfato quinasa).

La fosforilación de DHA catalizada por quinasa, utilizando ATP como donador de fosfato, es una aproximación descrita por primera vez por Wong y Whitesides utilizando la glicerol quinasa y ATP (Wong y Whitesides, 1983), donde la baja especificidad por sustrato de la glicerol quinasa permite la fosforilación de la DHA (Crans y Whitesides, 1985a,b). Posteriormente, Itoh y colaboradores (1999) han demostrado que la enzima dihidroxiacetona quinasa (DHAK) isoenzima I de *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0354 es un buen biocatalizador para la producción de DHAP acoplada a la regeneración *in situ* de ATP mediante una acetato quinasa (AK).

En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha hecho su propia contribución a la búsqueda de herramientas que faciliten la explotación de aldolasas dependientes de DHAP diseñando un sistema multienzimático que permite la formación one-pot de enlaces C-C a partir de DHA (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004). Este sistema está basado en la ruta natural de oxidación del glicerol en la bacteria *Citrobacter freundii* (Daniel *et al.*, 1995) donde la fosforilación de la DHA se lleva a cabo mediante una dihidroxiacetona quinasa dependiente de ATP. Así, la ruta descrita por nuestro grupo integra tres elementos en un único paso de reacción (Fig. 15): (1) la fosforilación de la DHA catalizada por la DHAK de *C. freundii*; (2) la reacción aldólica catalizada por la L-fuculosa-1-fosfato aldolasa de *E. coli* y (3) la regeneración de ATP catalizada por la AK de *E. coli* usando acetilfosfato como donador de fosfato.

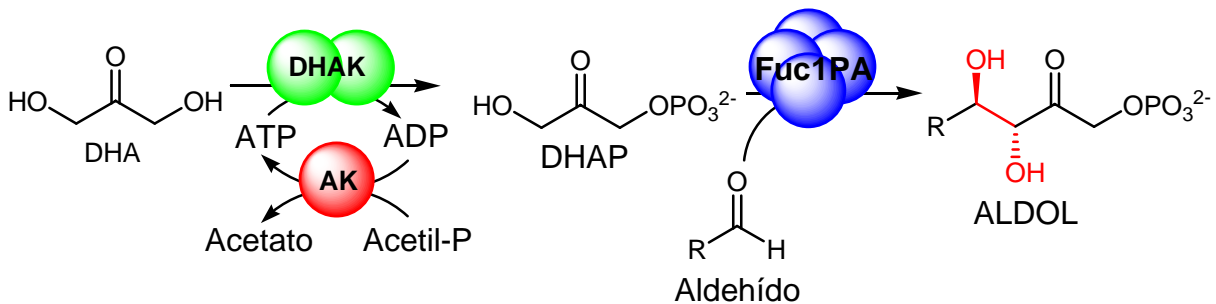


Figura 15. Sistema multienzimático acoplado para la formación de aldoles a partir de DHA formado por la DHAK de *C. freundii*, la Fuc1PA de *E. coli* y la AK de *E. coli*.

Este sistema permite la síntesis de DHAP en un único paso a partir de DHA comercialmente accesible. Permite, además, la utilización de cantidades catalíticas de ATP, que es un sustrato caro, empleando acetilfosfato como donador de fosfato en la regeneración, que es un sustrato fácilmente accesible (Crans y Whitesides, 1983).

Aunque este sistema es muy interesante ya que permite la formación de enlaces C-C a partir de DHA, solucionando así el inconveniente que presenta la utilización de aldolasas dependientes de DHAP, presenta dos puntos susceptibles de optimización: la necesidad de emplear un sistema de regeneración de ATP y el hecho de necesitar el empleo de tres enzimas.

Actualmente, en nuestro grupo, se están desarrollando dos vías de optimización de estos dos puntos que permitirían una simplificación de este sistema multienzimático:

- la evolución dirigida de la DHAK buscando que acepte polifosfato inorgánico como fuente de fosfato. Esto permitiría eliminar la AK y la utilización de ATP, además de eliminar la necesidad de controlar continuamente el pH del medio. Esta vía está siendo estudiada como parte de la Tesis Doctoral de Israel Sánchez-Moreno.
- la obtención de un enzima bifuncional quinasa-aldolasa que presente ambas actividades en una única cadena polipeptídica. Esto simplificaría el sistema reduciendo de tres a dos los enzimas necesarios, lo que supone una notable simplificación operacional y una disminución de los

costes del proceso (Asenjo y Andrews, 2008). Además, esperamos que la aplicación de un enzima bifuncional permita obtener mejoras en el comportamiento cinético del sistema respecto a la aplicación de los enzimas libres como consecuencia de un “efecto de proximidad”. Esta segunda vía es parte del trabajo desarrollado en la presente Memoria de Tesis Doctoral.

Enzimas de fusión en biotecnología.

Una proteína de fusión es una proteína generada mediante ingeniería genética a partir de dos o más péptidos o proteínas. Para obtener el gen quimera en fase mediante fusión génica es necesario eliminar el codón de stop correspondiente al primer péptido y añadirle el gen del segundo péptido, manteniendo la fase de lectura para que el nuevo gen de fusión pueda ser expresado como una única proteína. Estos nuevos enzimas de fusión presentan como principales ventajas la simplificación que supone la expresión, purificación y manipulación de dos o más actividades enzimáticas en una única cadena polipeptídica, tanto desde un punto de vista operacional como económico (Asenjo y Andrews, 2008); y la generación de proximidad entre los centros catalíticos, lo que puede suponer una mejoría en las características cinéticas del sistema respecto a la aplicación de los enzimas independientes (Ovádi, 1991a).

Diseño de una proteína de fusión.

Las técnicas de DNA recombinante, donde genes completos o fragmentos se ensamblan para generar genes de fusión, permiten obtener proteínas recombinantes cuyas características suelen ser combinación de las proteínas parentales (Uhlén *et al.*, 1992). A la hora de diseñar un enzima de fusión es necesario tener una serie de factores en cuenta: las funciones enzimáticas a

fusionar y las características de las proteínas nativas; el orden de los genes en la construcción de fusión y el brazo espaciador entre dichos genes.

a) Características de las proteínas a fusionar

A la hora de diseñar el enzima de fusión es importante tener en cuenta las posibles interacciones entre subunidades que pueden tener lugar (Bülow y Mosbach, 1991). Cuando se fusionan dos proteínas monoméricas, α y β , la proteína de fusión resultante mantiene el carácter monomérico de los enzimas nativos y se puede representar como α - β (Fig. 16).

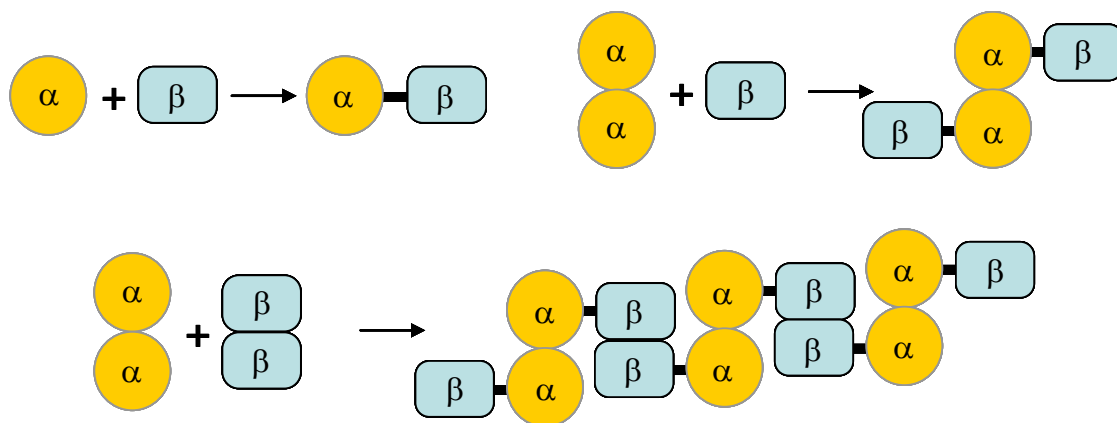


Figura 16. Representación esquemática de las interacciones que se pueden producir entre subunidades de una proteína de fusión.

Cuando los enzimas a fusionar no son monoméricos, la estructura cuaternaria se complica pudiendo dar lugar a estructuras macromoleculares complejas. Así, la fusión de un dímero $\alpha\alpha$ con un monómero β normalmente da lugar a una proteína de fusión dimérica cuya estequiometría se puede representar como β - $\alpha\alpha$ - β , donde las líneas representan la fusión. Cuando la fusión génica tiene lugar entre dos proteínas oligoméricas, la estructura cuaternaria es más difícil de predecir, pudiendo dar lugar a agregados macromoleculares de distintos tamaños y actividades. Por ejemplo, la fusión de una β -galactosidasa tetramérica de *E. coli* con una galactosa deshidrogenasa dimérica de *Pseudomonas fluorescens* (Ljungcrantz *et al.*, 1989) dio lugar a una proteína de fusión que se presenta como mezcla de dos formas, tetrámero y hexámero. Ambas estructuras disocian dando lugar al dímero mediante calentamiento 5 minutos a 60 °C, produciéndose la pérdida total de la actividad β -galactosidasa.

Esto indica que la estructura cuaternaria final de la proteína de fusión es clave para las actividades enzimáticas.

b) Orden de los genes en la fusión

El orden de los genes determina qué enzima forma el extremo N-terminal y cuál el C-terminal. Habitualmente no es considerado el factor más limitante y suele decidirse en función de la disponibilidad de los enzimas de restricción. Esto es debido a que, normalmente, los extremos N-terminal y C-terminal son zonas cargadas que se suelen orientar hacia la superficie de la proteína y permiten que la proteína de fusión mantenga intacta la estructura de las proteínas constituyentes. En el caso poco frecuente de que uno de los extremos de una de las proteínas esté involucrado en el centro activo o en interacciones entre subunidades, el otro extremo será el elegido para realizar la fusión. En cualquier caso, se debe tener en cuenta cualquier información estructural disponible.

c) Brazo espaciador

La construcción de una proteína de fusión supone la unión de dos macromoléculas donde la correcta elección de la secuencia conectora puede resultar crítica para el correcto plegamiento y el mantenimiento de las actividades de las proteínas fusionadas (Robinson y Sauer, 1998). La longitud de ese brazo espaciador es uno de los factores más importantes en su diseño ya que debe ser suficientemente largo como para garantizar el correcto plegamiento de las proteínas pero a su vez, suficientemente corto como para permitir observar las mejoras cinéticas debido al efecto de proximidad (Carlsson *et al.*, 1996). Está descrito en la bibliografía que el tamaño óptimo para los brazos espaciadores en proteínas de fusión está entre 2 y 10 aminoácidos ya que brazos más largos pueden ser más propensos a sufrir degradación proteolítica *in vivo* dando lugar a una reducción significativa en la obtención de la proteína de fusión (Bülow, 1987).

La libertad en el diseño del brazo espaciador será función del método seleccionado para la obtención del gen de fusión, ya que la estrategia elegida puede ser limitante a la hora de diseñar la construcción.

Métodos de obtención de proteínas de fusión.

Las primeras proteínas de fusión se crearon mediante fusión génica en fase o “in-frame fusion” (Fig. 17). Esta metodología se basa en el uso de enzimas de restricción para cortar el DNA en fragmentos específicos que pueden ser reorganizados posteriormente dando lugar a nuevas combinaciones. El principal inconveniente de este sistema es su gran dependencia de la secuencia, ya que las posibilidades de fusión están limitadas por la disponibilidad de enzimas de restricción. Además, aplicando esta metodología se limita la elección del brazo espaciador, que suele venir fijado por la compatibilidad en los enzimas de restricción.

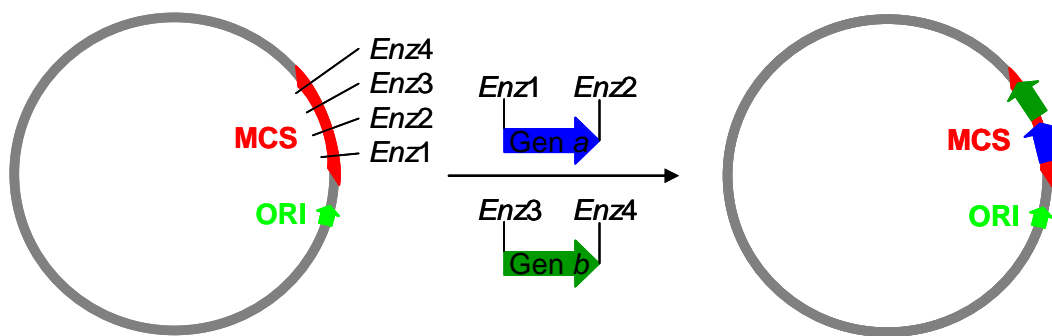


Figura 17. Fusión génica en fase basada en el empleo de enzimas de restricción.

Inicialmente, esta fue la metodología más empleada en la literatura. Por ejemplo, Kim y Weaber (1988) diseñaron una proteína de fusión que combinaba las actividades de la proteína A de *S. aureus* y la ricina A de *Ricinus communis*. El clonaje de ambos genes se realizó cortando el gen codificante para la ricina A y pegándolo en un vector de expresión que contenía el gen codificante para la proteína A, eliminando el codón de stop. El sitio de policlonaje utilizado y los enzimas de restricción seleccionados hicieron que se introdujera un brazo espaciador de 5 aminoácidos sobre el que no ha habido control.

La aparición de la técnica de PCR supuso un gran avance en el desarrollo de las proteínas de fusión, ya que permite amplificar los fragmentos de fusión con independencia de la secuencia. Esta nueva metodología permite recombinar fragmentos de DNA sin utilizar endonucleasas ni ligasas, lo que confiere una mayor flexibilidad de diseño. El método de los cuatro primers o SOE (gene splicing by overlap extensión) permite, mediante dos etapas de PCR, obtener un gen de fusión (Horton *et al.*, 1989). Para ello, en una primera etapa se amplifican de manera independiente los fragmentos que se van a fusionar (**AB** del gen I y **CD** del gen II) en dos PCRs, independientemente del organismo de origen, de la secuencia o del sitio de policlonaaje (Fig. 18).

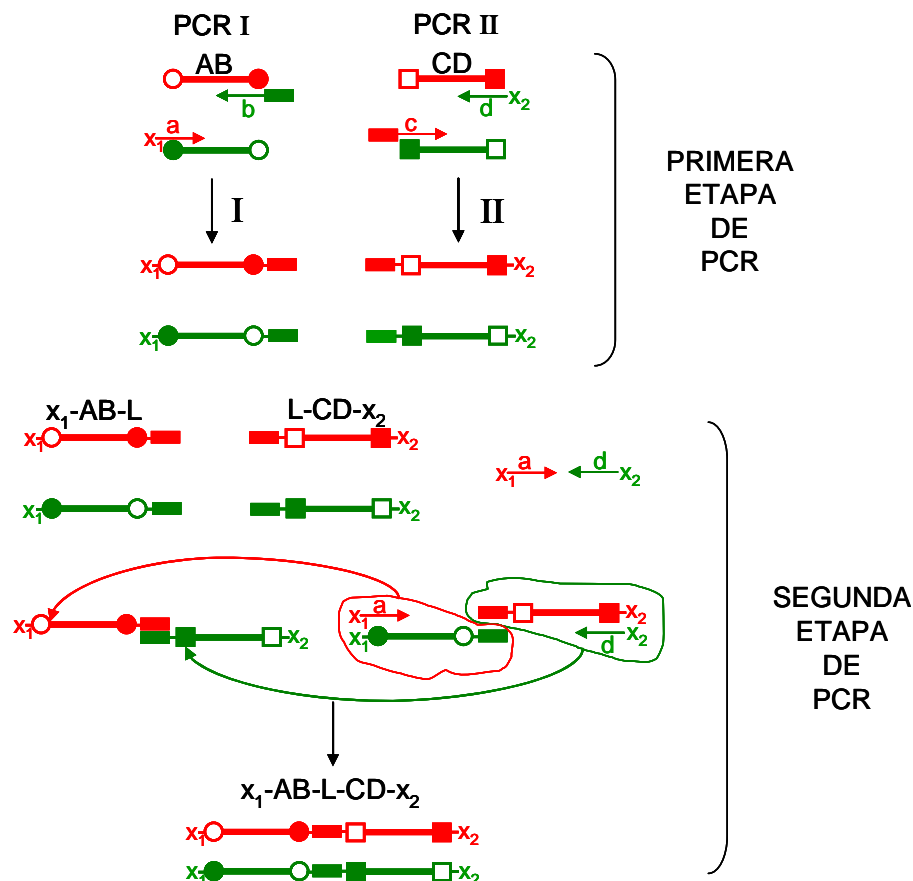


Figura 18. Método de los cuatro primers. En rojo se muestran las hebras en sentido directo (3'-5') y en verde las complementarias reversas (5'-3'). En ambos casos, los extremos 3' se muestran con el círculo o el cuadrado abierto, mientras los extremos 5' se indican con el círculo o el cuadrado cerrado.

Los primers utilizados en los extremos que a su vez serán extremos del gen de fusión (**a** y **d**) se diseñan incluyendo la secuencia diana para los enzimas de

restricción de interés (x_1 y x_2 respectivamente). Los primers de los extremos que deben ser fusionados se diseñan complementarios entre sí, incluyendo la secuencia conectora (**b** y **c**). De esta manera, los productos de las dos PCRs de esta primera etapa son complementarios y se solapan. Estos fragmentos se mezclan en una nueva PCR junto con los primers **a** y **d**, donde se someten a sucesivos ciclos de desnaturalización, anillamiento y elongación. De las dos hebras del fragmento **AB**, la que contiene la secuencia que se solapa en el extremo 3' puede actuar como primer de la hebra que tiene la secuencia conectora en 5' del fragmento **CD**. Este comportamiento es recíproco. Las otras dos hebras que no pueden actuar como primer una de otra sí pueden actuar como molde de PCR con los primers **a** y **d**.

Esta metodología permite, por un lado, controlar los sitios de corte en los extremos del gen de fusión, lo que simplifica su introducción posterior en un vector de expresión. Por otra parte permite controlar la región de fusión, pudiendo introducirse secuencias espaciadoras que faciliten el correcto plegamiento de las proteínas fusionadas. Además, permitiría, con un correcto diseño de los primers, realizar mutagénesis dirigida junto con la fusión, realizando inserciones, deleciones o cambios dentro de la secuencia.

Los primeros inconvenientes de este método, como la disponibilidad o accesibilidad a los primers, han sido superados con el desarrollo tecnológico y la automatización de la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Otro inconveniente que presentaba esta técnica en sus inicios era la tasa de mutaciones que se podían introducir en los genes amplificados por PCR y su tamaño, pero la aplicación en la actualidad de DNA polimerasas de alta fidelidad de copia permite reducir la frecuencia de error por debajo de 10^{-5} - 10^{-6} y permite amplificar fragmentos de hasta 6000 pb.

Actualmente, existen diversos trabajos descritos en bibliografía que utilizan una combinación entre la metodología clásica basada en el uso de endonucleasas y la metodología basada en el uso de la PCR. En estos casos, parten de un diseño inicial en casete de uno de los genes y amplifican el otro mediante PCR, pudiendo así tener más control sobre los enzimas de restricción a utilizar y sobre el brazo espaciador de la construcción final de fusión. Este es el caso

más indicado cuando se trata de continuar trabajos donde los estudios previos de fusión han presentado problemas y se busca modificar algún elemento concreto de la fusión como el brazo espaciador o una de las funciones fusionadas (Sachadyn *et al.* 2007; Stanislawska-Sachadyn *et al.*, 2006).

Aplicaciones biotecnológicas de las proteínas de fusión.

Las proteínas bifuncionales de fusión han tenido grandes aplicaciones en el campo de la biotecnología, que van desde las aplicaciones analíticas (Mizuno *et al.*, 2006) a la ingeniería del metabolismo (Tian y Dixon, 2006).

Una de las principales aplicaciones de las proteínas de fusión es su utilización en purificación de proteínas. La base de los procesos de separación puede ser una diferencia en carga eléctrica, solubilidad, tamaño, hidrofobicidad o afinidad específica de la proteína de interés por un determinado compuesto. De todas ellas, la afinidad es el criterio de purificación más selectivo pero su especificidad implicaría la obtención de una columna concreta para cada proteína a purificar, lo cual es operacionalmente inviable. La aplicación de la fusión de proteínas permite invertir este punto, de manera que se modifica la proteína para conferirle una determinada afinidad por un compuesto para el que existe un método de separación. La idea consiste en fusionarle a la proteína de interés un péptido que tenga unas características de unión específicas y que permita utilizar sus propiedades en la separación. De esta manera sólo es necesaria una columna para cada cola. Existen diversos tipos de proteínas y péptidos descritos en bibliografía utilizados para la purificación de proteínas de fusión (Stahl *et al.*, 2003; Trejo y Coughlin, 1999, Lichty *et al.* 2005). Actualmente, esta aplicación se encuentra ya tan extendida, que muchos de los vectores comerciales para la expresión de proteínas incorporan una zona del plásmido que fusiona a la proteína recombinante una de estas colas o “tags”.

Esta aproximación de fusión de colas de afinidad no se limita a su aplicación en la purificación de proteínas, sino que, además, puede servir para la

inmovilización de la proteína de interés para su aplicación en construcción de chips y microarrays (Kindermann *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2006) (Fig. 19).

Otro de los campos donde el uso de proteínas de fusión tiene gran interés es en el campo del diseño de biosensores. En este caso, una de las actividades enzimáticas de la proteína de fusión se utiliza como método de detección de la otra (Narita *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Los casos más habituales son el empleo de la GFP (Guan *et al.*, 2007; Stanislawaska-Sachadyn *et al.*, 2006) o de la β -galactosidasa (Sachadyn *et al.*, 2007; Corchero y Villaverde, 1999) aunque también se puede aplicar la fusión a otros marcadores como la fosfatasa alcalina (Urban *et al.*, 1990). En estos casos, la detección es debida a una señal óptica, por emisión de fluorescencia o mediante un ensayo enzimático que dé lugar a un cromóforo.

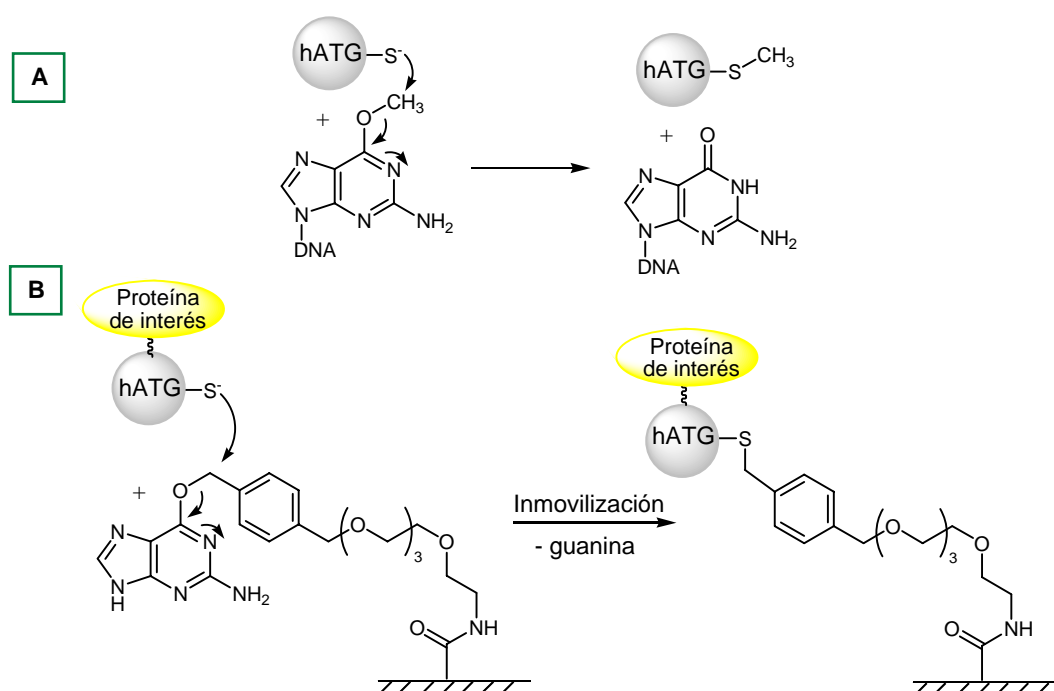


Figura 19. Aplicación de los enzimas de fusión a la construcción de microarrays.

Por último, la aplicación de proteínas de fusión dentro del contexto de la biocatálisis es mucho menor (Zhang *et al.*, 2006; Khang *et al.*, 2003), y eso a pesar de que la construcción de enzimas de fusión bifuncionales presenta dos ventajas fundamentales frente a la utilización de los enzimas independientes: por un lado, supone una simplificación en la expresión y purificación de las dos

actividades ya que se encuentran en una única cadena polipeptídica, con lo que eso implica en cuanto a simplificación de manejo y abaratamiento de costes; por otro lado, la proximidad que impone la fusión entre los centros activos que catalizan reacciones secuenciales puede suponer un aumento en la velocidad de la reacción global. Este efecto puede ser especialmente interesante también en el caso de que el producto intermedio sea inestable en el medio de reacción. Este efecto de proximidad conseguido en la aplicación de enzimas de fusión se encuentra ampliamente descrito en bibliografía (Tamada *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000; Ljungcrantz *et al.*, 1989). Este es el caso de la obtención de una proteína bifuncional α -1,3-galactosiltransferasa por fusión con una UDP-galactosa-4-epimerasa (Chen *et al.*, 2000). Este nuevo enzima de fusión permite, manteniendo la especificidad por el aceptor de la función transferasa, sustituir el donador UDP-galactosa por UDP-glucosa (Fig. 20). La aplicación del nuevo enzima de fusión permite mejorar las características cinéticas de la síntesis de Gal α 1,3Gal β 1,4Glc que suponen un aumento del 300% en las velocidades de reacción respecto a la aplicación de los enzimas aislados gracias al efecto de proximidad que genera la fusión en este caso. Además, permite la reducción del coste 40 veces en la síntesis del epítipo Gal α 1,3Gal gracias a la sustitución de UDP-galactosa por UDP-glucosa. La síntesis de estos epítipos Gal α 1,3Gal es especialmente interesante en el campo de la biomedicina ya que este tipo de oligosacáridos están involucrados en las interacciones que pueden dar lugar a rechazo en xenotransplantes.

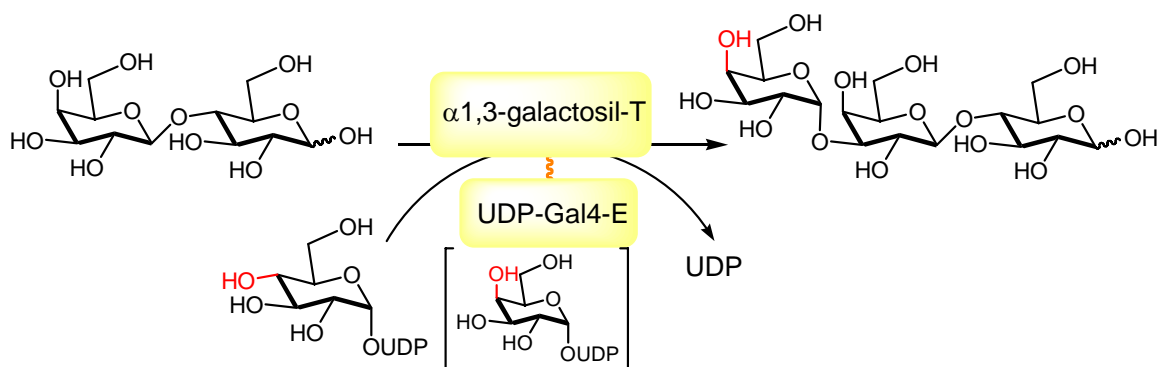


Figura 20. Reacción catalizada por el enzima de fusión UDP-galactosa-4-epimerasa/ α -1,3-galactosiltransferasa.

Una aplicación muy interesante de las proteínas de fusión es su introducción dentro del campo de la ingeniería de metabolismo, ya que permite la simplificación de la transformación de las distintas rutas metabólicas. Esto es especialmente destacable cuando se trata del metabolismo de plantas, donde la transformación es mucho más difícil que en bacterias. En este sentido, el trabajo de Tian y Dixon (2006) muestra el diseño una proteína bifuncional isoflavona sintasa/chalcona isomerasa y su incorporación al metabolismo de plantas no leguminosas (Fig. 21). Mediante combinación de modelado molecular, ingeniería de proteínas *in vitro* e ingeniería de metabolismo en planta consiguen aumentar la acumulación de compuestos isoflavonoides en las hojas de las plantas.

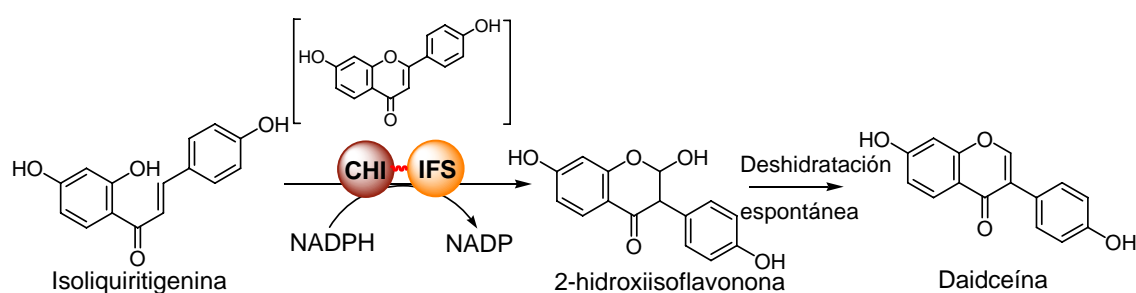


Figura 21. Reacción catalizada por el enzima de fusión isoflavona sintasa/chalcona isomerasa.

Un ejemplo más reciente de la obtención de enzimas de fusión para su aplicación en síntesis es la construcción de un biocatalizador redox dos-en-uno (Torres-Pazmiño *et al.*, 2008) que permite, con una única cadena polipeptídica, llevar a cabo la reacción de Baeyer-Villiger y la regeneración ortogonal del coenzima empleando fosfito como donador de electrones de la regeneración (Fig. 22).

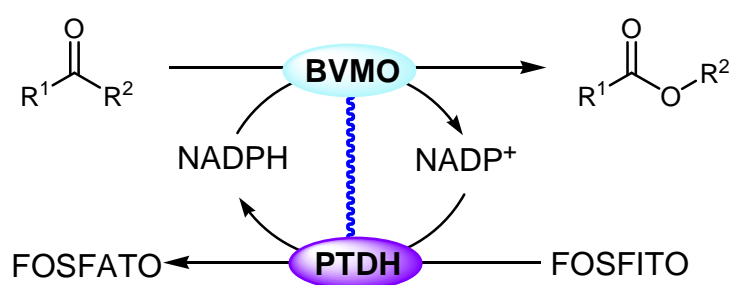


Figura 22. Reacción catalizada por el enzima de fusión monooxigenasa/fosfito deshidrogenasa.

En este trabajo estudian la fusión de tres Baeyer-Villiger monooxigenasas diferentes (BVMO) a la fosfito deshidrogenasa (PTDH) como enzima de regeneración de coenzima, no observando efecto sobre la eficiencia catalítica de ninguna de las actividades con la fusión. Las BVMOs fusionadas son complementarias en cuanto a sustrato y estereoselectividad, lo que sugiere una gran aplicabilidad potencial de los nuevos biocatalizadores construidos para la obtención de intermedios quirales en la síntesis de compuestos bioactivos. Además, la construcción del enzima de fusión permite aplicar un biocatalizador autosuficiente, es decir, un único biocatalizador que lleva a cabo tanto la reacción de Baeyer-Villiger de interés como la regeneración del cofactor.

OBJETIVOS

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se puede englobar en dos grandes objetivos. En primer lugar, nos planteamos desarrollar el sistema multienzimático diseñado previamente en nuestro laboratorio y descrito en la Introducción, ampliando su aplicación a otras aldolasas dependientes de DHAP y estudiando su utilidad sintética con una batería de aldehídos representativos de una gran diversidad estructural. En segundo lugar, nos planteamos la simplificación de dicho sistema multienzimático mediante la creación y aplicación de un enzima bifuncional quinasa-aldolasa, que reúna en una única cadena polipeptídica estas dos actividades.

Estos dos grandes objetivos generales se pueden concretar en los siguientes objetivos particulares:

- Estudio de la aplicabilidad del sistema multienzimático acoplado en la síntesis de enlaces C-C.
 - Optimización del sistema de expresión de la L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *E. coli*.
 - Optimización del sistema de expresión de la L-fuculosa-1-fosfato aldolasa de *E. coli*.
 - Estudio de la aplicabilidad del sistema multienzimático acoplado en la formación de enlaces C-C:
 - estrategia en un paso (*one pot/one step*)
 - estrategia en dos pasos (*one pot/two steps*)
- Simplificación del sistema multienzimático acoplado mediante la aplicación de un enzima bifuncional quinasa-aldolasa.

- Diseño y obtención de un enzima bifuncional quinasa-aldolasa.
- Clonaje y sobreexpresión del enzima fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *Staphylococcus carnosus*.
- Caracterización estructural del enzima de fusión mediante dicroísmo circular y análisis del efecto de fusión en la estructura de la proteína.
- Estudio estructural y funcional de la estabilidad térmica del enzima de fusión.
- Caracterización bioquímica del enzima bifuncional. Estudio comparativo del enzima de fusión con los enzimas nativos.
- Aplicación sintética del enzima bifuncional para la formación de enlaces C-C.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Las cepas bacterianas utilizadas en esta memoria han sido: K12 (ATCC 86984), DH5 α y BL21(DE3) (Promega) de *Escherichia coli* y la cepa CECT 4491 de *Staphylococcus carnosus*.

El plásmido pGEM-T Easy fue adquirido a Promega y el plásmido pET-28b(+) fue suministrado por Novagen.

Los cebadores de PCR fueron adquiridos en Isogen. La T4-DNA polimerasa fue adquirida en MBI Fermentas, al igual que el patrón de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder y los enzimas de restricción *EcoRI*, *XhoI*, *HindIII*, *BamHI*, *NheI* y *NdeI*.

La purificación de fragmentos de DNA a partir de bandas de gel de agarosa se realizó con el kit Perfectprep[®] Gel Cleanup de Eppendorf. Para obtener plásmidos a partir de cultivos bacterianos se usó el kit GenElute[™] Plasmid Miniprep de Sigma.

La solución de Acrilamida/Bis-acrilamida 30% (29:1) para analizar muestras de proteínas por SDS-PAGE fue adquirida en Bio-Rad, y el patrón de pesos moleculares Low Molecular Weight Calibration Kit en GE Healthcare.

La AK, la α GDH/TIM y la lisostafina fueron adquiridas en Sigma-Aldrich. La lisozima fue adquirida a USB Corporation y la DNasa a Roche. El IPTG y el imidazol fueron suministrados por Acros Organics. La DHAP fue suministrada por Fluka. Los antibióticos estreptomocina sulfato, kanamicina sulfato y

ampicilina, el ATP, el acetilfosfato, el NADH, los distintos aldehídos y el resto de reactivos de rutina utilizados en esta memoria fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

La dihidroxiacetona quinasa de *Citrobacter freundii* ha sido clonada en nuestro laboratorio (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004).

Las membranas de diálisis Spectra/Por[®], adecuadas para la diálisis de proteínas de peso molecular superior 12000-14000 Da, son de la marca Spectrum.

Los componentes de los distintos medios de cultivo (extracto de levadura, triptona, extracto de carne y agar), al igual que la agarosa D-1 Medium EEO, fueron adquiridos a Pronadisa.

La amplificación de DNA se hizo en un Mastercycler Personal de Eppendorf. Los geles de agarosa para electroforesis de DNA se resolvieron en una cubeta RunOne[™] Electrophoresis Cell de EmbiTec. Los geles de acrilamida/bisacrilamida para SDS-PAGE de proteínas se resolvieron en una cubeta MiniProtean[®] 3 de Bio-Rad. El análisis densitométrico de los geles de agarosa y de acrilamida se realizó en un fotodocumentador Gene Flash Bio Imaging de Syngene LTD con el programa GeneTools 3.07.

Los cultivos celulares se incubaron en un agitador orbital termostatzado Lab-Shaker de Adolf Kühner AG.

La resina de Ni⁺²-agarosa fue suministrada por Agarose Bead Technologies (ABT). Las columnas cromatográficas Glass Econo-Column[®] (Ø=2.5 cm) para la purificación de proteína se adquirieron en Bio-Rad. Para la purificación de proteínas DLF y FBPA se utilizó una columna de exclusión molecular HiLoad 26/60 Superdex 75 PG controlada por un sistema AKTA-FPLC de GE Healthcare Life Science. Las muestras de proteína pura se liofilizaron en un liofilizador Lioalfa 6 de Telstar.

Los ensayos espectrofotométricos se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis SPECTRAMax-384 PLUS, de Molecular Devices. Los estudios de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-810

controlado por el software Spectra Manager™ para Windows, equipado con un Peltier Jasco PTC423-S. El análisis de los espectros de dicroísmo circular se realizó con el paquete informático CDPro compuesto por tres programas de cálculo: Continll, SELCON3 y CDSSTR.

MÉTODOS

Metodologías generales.

Las técnicas básicas de manipulación de DNA (PCR, clonaje, ligamiento, transformación, etc.) se realizaron según se describen en Sambrook *et al.* (1989).

Los distintos fragmentos de DNA se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8) con bromuro de etidio (0.4 µg/mL).

La secuenciación de los diferentes genes se realizó en el Centro de Secuenciación de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Para la sobreexpresión de proteínas cuyo gen se clonó en el vector pET-28b(+) el protocolo seguido fue el mismo en todos los casos. Los clones de pET-GEN/BL21 se crecieron en medio LB conteniendo 26.3 µg/mL de kanamicina a 37 °C hasta una O.D._{600 nm}~0.5. En ese momento la expresión se indujo con IPTG 0.4 mM y el cultivo se mantuvo O/N a 30 °C. Para la extracción de las proteínas, los cultivos se centrifugaron a 3000 g durante 30 min. a 4 °C y las células se sometieron a tratamiento con lisozima (Bastida *et al.*, 2001). Para ello, las células se resuspendieron en tampón TRIS 50 mM, pH 8 (8 mL/g) y se añadió lisozima (2 mg/g) células en una solución de EDTA 50 mM pH 8.2. La suspensión se agitó fuertemente a temperatura ambiente durante 1 hora y después se dejó agitando a 4 °C O/N. A esta solución viscosa se le añadieron 10 µg DNasa/g de células y MgCl₂ 0.95 µg/mL y se agitó a 4 °C durante 30 min.

La mezcla se centrifugó durante 30 min. a 13000 g para separar el extracto crudo de proteínas solubles de los cuerpos de inclusión. A continuación, se añadió un 1% de estreptomicina sulfato al sobrenadante y se agitó durante 20 min. a 4°C. La mezcla se centrifugó durante 30 min. a 13000 rpm y 4 °C para obtener el extracto crudo de proteínas solubles (CFE) libre de ácidos nucleicos

Como vector de expresión de todas las proteínas clonadas en esta memoria se seleccionó el pET-28b(+), de 5369 pb, que es un plásmido de alto número de copia, que introduce resistencia a kanamicina, cuyo promotor proporciona altos niveles de sobreexpresión de la proteína recombinante y que además expresa la proteína fusionada a un pequeño péptido en el extremo N-terminal que contiene seis histidinas. Esta cola de histidinas presenta alta afinidad por cationes divalentes facilitando la purificación de la proteína a partir del extracto total de proteína soluble mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). Esta purificación la llevamos a cabo en minicolumnas cromatográficas ($\varnothing = 0,7$ cm; Bio-rad) con resinas de Ni^{+2} -IDA-agarosa de alta densidad (30-40 $\mu\text{mol Ni}^{+2}/\text{mL}$ resina).

La cuantificación de proteína purificada se realizó mediante medida de absorbancia a 280 nm. Para ello, realizamos espectros de absorbancia a temperatura ambiente entre 190 y 400 nm en cubetas de paso óptico 1 cm. Para el cálculo de concentraciones se utilizaron los coeficientes de extinción molar teóricos de la Rham1PA y Fuc1PA ($\epsilon^{280} = 46350$ y $21680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente) y los coeficientes de extinción molar experimentales, calculados a partir del análisis de aminoácidos, para la DHAK , FBPA y DLF ($\epsilon^{280} = 35599$, 46292 y $77928 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente). El análisis de aminoácidos se realizó en el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Los ensayos de equilibrio de sedimentación de las distintas proteínas fueron realizados en el departamento de Química-Física de Macromoléculas Biológicas del Instituto de Química-Física “Rocasolano”, CSIC. Además, los estudios de huella peptídica fueron realizados en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC.

Los ensayos espectrofotométricos para la determinación de actividades enzimáticas se basan en la reacción de reducción de DHAP a glicerol fosfato catalizada por la α GDH con oxidación concomitante de NADH a NAD⁺, lo que produce una disminución en la absorbancia a 340 nm ($\epsilon^{340} = 6220 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).

La actividad aldolasa se midió en función de la reacción retroaldólica que descompone el correspondiente sustrato natural en DHAP y aldehído. Por otro lado, la actividad quinasa se midió en función de la reacción de fosforilación de DHA con consumo de ATP, para generar DHAP.

Mediante una modificación de este ensayo espectrofotométrico, se pueden valorar los distintos productos de reacción (DHAP/DHA y DHAP/aldol) (Bergmeyer, 1984).

Sistema multienzimático acoplado para la formación estereoselectiva de enlaces C-C.

Obtención de la proteína L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de E. coli.

Amplificación del gen rhaD de E. coli.

El gen *rhaD* (825 pb) que codifica para la Rham1PA se amplificó por PCR (García-Junceda *et al.*, 1995).

El DNA molde para la amplificación del gen *rhaD* se obtuvo a partir de la cepa de *Escherichia coli* K12 (ATCC 86984). Para ello se resuspendió 1 colonia en 40 μL de LB, de los cuales se lisaron 10 μL en 40 μL de colony lysis buffer (Tris-HCl 20mM, pH 8.5; Tritón X-100, 1%; EDTA 2 mM).

La amplificación del gen *rhaD* se realizó en un volumen final de 10 μL mediante 30 ciclos de temperatura. Las secuencias de los cebadores diseñados para esta amplificación y las condiciones de PCR se encuentran recogidos en las Tablas 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Secuencias de los oligos cebadores empleados para la amplificación por PCR de los genes *rhaD* y *fucA*.

Fragmento	Extremo	Primers	Diana
<i>rhaD</i>	NtHrhaD	5'-ATATTA AAGCTT CAAAACATTACTCAG-3'	<i>Hind</i> III
	CtXrhaD	5'-TATTA CTCGAG TTACAGCGCCAGCGCACTGGC-3'	<i>Xho</i> I
<i>fucA</i>	NtNfucA	5'- ATATT GCTAGC GAACGAAATAAACTTGCT -3'	<i>Nhe</i> I
	CtBfucA	5'- TATTA GGATCC TTACTCTTCAATTCG -3'	<i>Bam</i> HI

Las bases señaladas **en negrita** se corresponden con las secuencias diana del correspondiente enzima de restricción.

Tabla 3. Condiciones de reacción para la amplificación por PCR de los genes *rhaD* y *fucA*.

		<i>rhaD</i>	<i>fucA</i>
Condiciones de reacción (10 µL)	Tampón 10x	1 µL	1 µL
	MgCl ₂ (50mM)	0.6 µL	0.3 µL
	dNTPs (10mM)	1 µL	0.2 µL
	Template	0.6 µL	0.6 µL
	H ₂ O	6.5 µL	7.6 µL
	Nt (100µM)	0.1 µL	0.1 µL
	Ct (100µM)	0.1 µL	0.1 µL
	Ecotaq (5 U/ µL)	0.1 µL	0.1 µL
Ciclo de T ^a	Desnaturalización	94 °C -1 min	94 °C -1 min
	Anillamiento	55 °C -1 min	55 °C -1 min
	Elongación	72 °C -1 min	72 °C -1 min

Clonaje del gen rhaD.

El inserto *rhaD* procedente de la PCR, una vez purificado del gel de agarosa y el plásmido pET-28b(+) (5369 pb) se sometieron a una doble digestión con los enzimas de restricción *Hind*III y *Xho*I en un volumen de reacción de 100 μ L según el protocolo estándar del fabricante. Tras la purificación, se procedió al ligamiento del inserto *rhaD* en el vector doblemente digerido de pET-28b(+), con una relación vector/inserto 1:1, usando T4 DNA ligasa y una concentración 1 mM de ATP. El vector de expresión pET-*rhaD* así construido se utilizó para transformar células competentes BL21(DE3) que después se crecieron sobre placas de LB-agar que contenían 26.3 μ g/mL de kanamicina. De las colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 10 al azar y se chequearon por PCR. Las colonias positivas se crecieron en 5 mL LB-kanamicina para purificar el plásmido y se conservaron a -80 °C. Estos plásmidos se secuenciaron usando el cebador de secuenciación del promotor de la T7-DNA polimerasa para verificar la secuencia completa del gen *rhaD*.

Sobreexpresión y purificación del enzima Rham1PA.

Para la sobreexpresión de la Rham1PA se seleccionó una de las colonias positivas que contenía el gen *rhaD* y se creció un cultivo del clon pET-*rhaD*/BL21 en medio LB según el protocolo descrito en el apartado de “Metodologías Generales”.

La proteína recombinante Rham1PA se purificó en un único paso a partir del extracto de proteína soluble, mediante IMAC con elución por pH (García-Junceda *et al.*, 1995).

Así, la columna de resina de Ni⁺²-IDA-agarosa de alta densidad se lavó con 5 volúmenes de agua por cada volumen de resina y se equilibró con 10 volúmenes de tampón fosfato sódico 20 mM, pH=6 que contenía 500 mM de NaCl. A continuación se cargó la columna con 1 volumen de CFE y se lavó con 10 volúmenes del mismo tampón. Para eluir la Rham1PA se utilizó el mismo tampón fosfato sódico 20 mM, NaCl 500 mM pero esta vez ajustado a pH=4. La elución de la proteína se monitorizó espectrofotométricamente por medida de

absorbancia a 280 nm. Todas las fracciones con absorbancia mayor de 0.5 se mezclaron y su pH se ajustó a 7-7.5 para su uso.

Obtención de la proteína L-fuculosa-1-fosfato aldolasa de E. coli.

Amplificación del gen fucA de E. coli.

El gen *fucA* (651 pb) que codifica para la Fuc1PA se amplificó por PCR a partir de la cepa K12 (ATCC 86984) de *E. coli* (García-Junceda *et al.*, 1995). El DNA molde se obtuvo de la misma manera que para la amplificación del gen *rhaD*.

La amplificación del gen *fucA* se realizó en un volumen final de 10 μ L mediante 30 ciclos de temperatura. Las secuencias de los cebadores diseñados para esta amplificación y las condiciones de PCR se encuentran recogidas en las Tablas 2 y 3 respectivamente.

Clonaje del gen fucA.

El inserto *fucA* procedente de la PCR una vez purificado del gel de agarosa, se sometió a ligamiento con el vector pGEM-T Easy según el protocolo del fabricante. La construcción en pGEM así obtenida se utilizó para transformar células competentes DH5 α que después se crecieron sobre placas de LB-agar que contenían 250 μ g/mL de ampicilina. De las colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 10 al azar y se chequearon por corte con el enzima de restricción *EcoRI*. Las colonias positivas se crecieron en 5 mL de LB-ampicilina (250 μ g/mL) para purificar plásmido. Estos plásmidos se secuenciaron usando el cebador de secuenciación del promotor de la T7-DNA polimerasa

Posteriormente, el gen *fucA* se subclonó en el vector de expresión pET-28b(+) entre las dianas específicas de los enzimas de restricción *BamHI* y *NheI*. Así, tanto la construcción pGEM-*fucA* como el plásmido pET-28b(+) se digirieron con dichos enzimas de restricción según las instrucciones del fabricante. Tanto el inserto correspondiente al gen *fucA* como el vector de pET-28b(+) doblemente digeridos se purificaron de gel de agarosa al 0.8% en TAE. A continuación, se ligaron usando la T4 DNA ligasa con una relación

vector/inserto 1:1 y una concentración 1 mM de ATP. La mezcla de ligación de la construcción pET-fucA así obtenida, se transformó en células competentes DH5 α que después se crecieron sobre placas de LB-agar que contenían 26.3 μ g/mL de kanamicina. De las colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 10 al azar, se chequearon por PCR y se conservaron a -80 °C.

Para la expresión de la proteína recombinante, células competentes BL21(DE3) se transformaron con la construcción pET-fucA.

Sobreexpresión y purificación del enzima Fuc1PA.

Para la sobreexpresión de la Fuc1PA se seleccionó una de las colonias positivas que contenía el gen *fucA* y se creció un cultivo del clon pET-fucA/BL21 en medio LB según el protocolo descrito en el apartado de “Metodologías Generales”.

La proteína recombinante Fuc1PA se purificó en un único paso a partir del extracto crudo de proteína soluble, mediante IMAC con elución por pH. El protocolo seguido fue el mismo que el descrito para la Rham1PA (García-Junceda *et al.*, 1995).

Ensayos de actividad.

Síntesis de sustratos no comerciales: L-lactaldehído, L-rhamnulosa-1-fosfato y L-fuculosa-1-fosfato.

Para la medida de la actividad aldolasa de la Rham1PA y la Fuc1PA es necesario utilizar sus sustratos naturales, L-rhamnulosa-1-fosfato (Rham1P) y L-fuculosa-1-fosfato (Fuc1P) respectivamente, como sustrato en la reacción retroaldólica. Estos sustratos se sintetizaron enzimáticamente a partir de DHA y L-lactaldehído. A su vez, el L-lactaldehído no es comercial y se sintetizó a partir de D-treonina según el método descrito anteriormente (Zagalak *et al.*, 1966).

Síntesis de L-lactaldehído :

9.1 g de ninhidrina (51 mmol) y 3 g de D-treonina (25 mmol) se hirvieron, con agitación fuerte y a reflujo, en 600 mL de tampón citrato sódico 50 mM pH 5,4 durante 15 minutos. La suspensión se dejó enfriar, se filtró y se lavó el sólido

con agua miliQ. El filtrado (color rojo-violeta) se sometió a sucesivos pasos de intercambio iónico. Primero se trató con DOWEX 1x8 en su forma activada HCO_4^- hasta subir el pH a 6.5 y se mantuvo en agitación entre 2 y 3 horas. Posteriormente se filtró y el filtrado se trató con DOWEX 50x4 en su forma activa H^+ hasta bajar el pH a 4.0. Se filtró de nuevo y el filtrado se concentró en el rotavapor hasta un volumen de 100 mL. Fue necesario repetir estos pasos de intercambio iónico y concentración hasta que la disolución quedó incolora y en presencia de la resina de intercambio aniónico a pH 7.5 ésta no cambió de color, llegando a un volumen final de unos 20-30 mL.

La valoración de la concentración de L-lactaldehído en la disolución final se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico. El L-lactaldehído es oxidado a ácido acético por acción de la aldehído deshidrogenasa en presencia de NAD^+ . Esta reacción se puede seguir espectrofotométricamente midiendo el aumento de absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADH, que es directamente proporcional a la concentración de L-lactaldehído.

La valoración se realizó a temperatura ambiente en ensayos de 5 minutos en un volumen final de 1 mL, conteniendo TRIS-HCl 50 mM, pH 8, 0.4 μmol de NAD^+ y 1.5 U de aldehído deshidrogenasa.

Síntesis enzimática de los aldoles naturales L-rhamnulosa-1-fosfato y L-fuculosa-1-fosfato:

La Rham1P y la Fuc1P se sintetizaron utilizando el sistema multienzimático acoplado en las condiciones previamente descritas por Sánchez-Moreno *et al.* (2004) para la obtención de Fuc1P en una escala de 1 mmol.

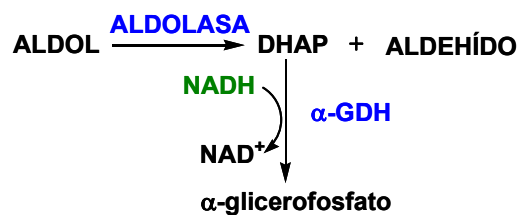
Para ello, la reacción se llevó a cabo en 30 mL de tampón HEPES 20 mM pH 7.5 que contenían 1 mmol de DHA, 1.5 mmol de L-lactaldehído, 2 mmol de acetilfosfato, 68 μmol de ATP, 250 μmol de MgSO_4 , 0.3 μmol de ZnCl_2 , 15 U de DHAK, 30 U de AK y aldolasa (Rham1PA o Fuc1PA). La actividad aldolasa añadida a la reacción se valoró *a posteriori*, comprobándose que se correspondía con 10 unidades de actividad aldolasa.

Tanto la Rham1P como la Fuc1P fueron purificadas por precipitación con sales de bario y posterior cromatografía de intercambio aniónico con Dowex 1x8 en

las condiciones descritas por Sims y Reed (2005). El espectro de RMN ^{13}C de los compuestos purificados fue coincidente con los previamente descritos (Liu *et al.* 1991).

Valoración de las actividades L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa y L-fuculosa-1-fosfato aldolasa.

La valoración de las actividades aldolasa se realizó midiendo la reacción retroaldólica según se ilustra en el Esquema 1. Las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente en ensayos de 5 minutos en un volumen final de 1 mL directamente en la cubeta del espectrofotómetro. La mezcla de reacción contenía una cantidad conocida de aldolasa (Rham1PA o Fuc1PA), en tampón Tris-HCl 40 mM, pH 8, con 0.015 μmol ZnCl_2 , 0.2 μmol de NADH, 2 U de α -GDH/TIM y 1 μmol de Rham1P o Fuc1P, respectivamente.

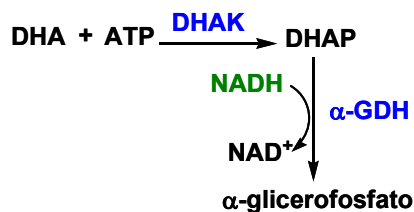


Esquema 1. Ensayo acoplado para la valoración de la actividad aldolasa.

Se define 1 unidad de actividad aldolasa (Rham1PA o Fuc1PA) como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de su aldol sustrato natural (Rham1P o Fuc1P, respectivamente) en dihidroxiacetona fosfato y L-lactaldehído por minuto en las condiciones mencionadas.

Actividad dihidroxiacetona quinasa.

La actividad DHAK se cuantificó valorando la DHAP formada en ensayos de 5 minutos a temperatura ambiente en un volumen final de 1 mL (Esquema 2). La mezcla de reacción contenía: Tris-HCl 40 mM, pH 8, 0.2 μmol de NADH, 2.5 μmol de DHA, 3.75 μmol de ATP, 5.0 μmol de MgSO_4 y 2 U de α -GDH/TIM.



Esquema 2. Ensayo acoplado para la valoración de la actividad DHAK.

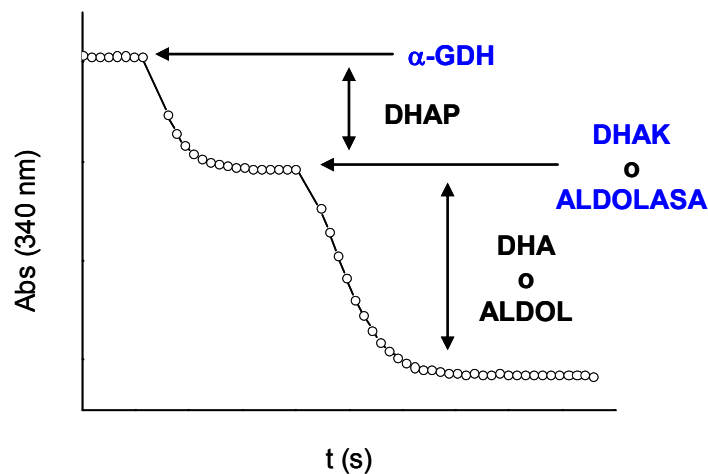
Se define 1 unidad de actividad quinasa como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de DHA en DHAP por minuto en las condiciones mencionadas.

Ensayos de valoración.

La valoración de DHAP/aldol y DHAP/DHA en una alícuota de reacción nos permite seguir el transcurso de la reacción con el tiempo. Para valorar los distintos tiempos de una reacción aldólica se tomaron alícuotas de 50 μL y la evolución de la reacción se detuvo por acidificación con 10 μL de HClO_4 (al 7%). Previamente a su valoración, las alícuotas fueron neutralizadas con 10 μL de NaOH 1M.

Valoración DHAP/aldol.

La valoración se realizó a temperatura ambiente en ensayos de 5-15 minutos en un volumen final de 1 mL en cubeta, conteniendo Tris-HCl 40 mM, pH 8, 0.015 μmol ZnCl_2 , 0.2 μmol de NADH y la muestra a valorar. La bajada en absorbancia al añadir 2 U/mL de α -GDH/TIM es proporcional al contenido en DHAP y la disminución de absorbancia al añadir 0.5 U/mL de aldolasa es proporcional a la cantidad de aldol (Esquema 3).



Esquema 3. Ensayos de valoración de las alícuotas de reacción.

Valoración DHAP/DHA.

La valoración se realizó a temperatura ambiente en ensayos de 5 minutos en un volumen final de 1 mL en cubeta, conteniendo Tris-HCl 40 mM, pH 8, 0.2 μ mol de NADH y 5 mM ATP, 3.75 mM $MgSO_4$ y la alícuota a valorar. La bajada en absorbancia al añadir 2 U/mL de α -GDH/TIM es proporcional al contenido en DHAP y la disminución de absorbancia al añadir 0.375 U/mL de DHAK es proporcional a la cantidad de DHA (Esquema 3).

Sistema multienzimático acoplado para la síntesis de enlaces C-C

Los nombres comerciales y las estructuras de los aldehídos utilizados para las reacciones aldólicas realizadas en esta memoria se encuentran recogidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Aldehídos utilizados en esta memoria.

R	Nombre	R	Nombre
R-*			
1	L-lactaldehído	7	fenilacetaldehído
2	CH ₃ -* acetaldehído	8	benciloxiacetaldehído
3	CH ₃ CH ₂ -* propionaldehído	9	3-(metiltio)propionaldehído
4	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -* butiraldehído	10	crotonaldehído
5	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -* n-valeraldehído	11	trans-cinamaldehído
6	isobutiraldehído	12	dimetoxiacetaldehído
		13	etil-3-metil-4-oxocrotonato

Reacciones en un paso (one-pot/one-step).

Las reacciones que se realizaron en un solo paso se llevaron a cabo a temperatura ambiente en 3 mL de tampón HEPES 20 mM, pH 7.5 conteniendo 0.1 mmol de DHA, 0.15 mmol de aldehído, 0.2 mmol de acetilfosfato, 25 μ mol de MgSO₄, 0.03 μ mol de ZnCl₂, 6 U de acetato quinasa y 1 U de aldolasa (Rham1PA o Fuc1PA). Las reacciones con Fuc1PA contenían 1.5 U de DHAK y las reacciones con Rham1PA contenían 1.7 U de DHAK.

Los aldehídos **8** y **11** requirieron la adición de DMSO (10% y 5% del volumen total de reacción respectivamente). El aldehído **7** contenía un 50% de alcohol bencílico, de forma que el contenido en alcohol de la mezcla de reacción fue de un 3.3%.

Las reacciones se iniciaron con la adición de 6.8 μ mol de ATP.

Reacciones en dos pasos (one-pot/two-steps).

Las reacciones que se realizaron siguiendo la estrategia de dos pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un volumen inicial de 2 mL de tampón HEPES 20 mM, pH 7.5 que contenía 0.1 mmol de DHA, 0.2 mmol de acetilfosfato, 25 μ mol de $MgSO_4$, 6.5 U de DHAK y 6 U de AK. El primer paso de reacción se inició con la adición de 6.8 μ mol de ATP.

Cuando la acumulación de DHAP en el medio de reacción era mayor del 95%, el pH se ajustó a 6.8 y el segundo paso de reacción se inició con la adición de 1 mL de agua que contenía 0.15 mmol de aldehído, 0.03 μ mol de $ZnCl_2$ y 1 U de aldolasa (Rham1PA o Fuc1PA). Como en el sistema en un paso, los aldehídos **8** y **11** requirieron la adición, en el segundo paso, de DMSO en un 10 y un 5% del volumen total de reacción, respectivamente.

Enzima de fusión dihidroxiacetona quinasa – fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa.

Obtención de la proteína fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de Staphylococcus carnosus.

Amplificación del gen fda.

El gen *fda* (891 pb) que codifica para la FBPA de *Staphylococcus carnosus* se amplificó por PCR. El DNA molde para la amplificación del gen *fda* se obtuvo a partir de la cepa CECT 4491 de *S. carnosus* (Witke y Götz, 1992).

Para extraer el DNA de *S. carnosus* se resuspendió el liofilizado suministrado por la CECT en medio de cultivo I (0.5 g extracto de carne, 1 g peptona, 0.5 g NaCl en 100 mL agua) y se creció el cultivo O/N a 37 °C. Se centrifugó 1 mL de este cultivo y las células se resuspendieron en 0.5 mL de solución de lisis (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, lisozima 200 U/mL y lisostafina 25 U/mL) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos (Ligozzi y Fontana, 2003). La

suspensión se calentó a 95 °C durante 10 minutos y a continuación se extrajo el DNA con fenol/cloroformo/isoamílico.

La amplificación del gen *fda* se realizó en un volumen final de 10 µL mediante 25 ciclos de temperatura. Las condiciones de PCR y las secuencias de los cebadores diseñados para esta amplificación se encuentran recogidas en las Tablas 5 y 6 respectivamente.

Tabla 5. Condiciones de reacción para la amplificación por PCR de los fragmentos *fda*, *dhak-l*, *l-fda* y *dhak-l-fda*.

		<i>dhak-l</i>	<i>fda-l</i>	<i>dhak-l-fda</i>	<i>fda</i>
Condiciones de reacción (10 µL)	Tampón 10x	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
	MgCl ₂ (50mM)	0.6 µL	0.5 µL	0.8 µL	0.4 µL
	dNTPs (10mM)	1 µL	0.8 µL	1 µL	0.8 µL
	Aditivo 5x	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
	Template	0.15 µL	0.5 µL	0.4 µL	0.5 µL
	H ₂ O	4.5 µL	4.45 µL	4.05 µL	4.55 µL
	Nt (100µM)	0.15 µL	0.15 µL	0.15 µL	0.15 µL
	Ct (100µM)	0.15 µL	0.15 µL	0.15 µL	0.15 µL
	EcotaqPlus (4 U/ µL)	0.45 µL	0.45 µL	0.45 µL	0.45 µL
Ciclo de T ^a	Desnaturalización	94 °C -1 min	94 °C -1 min	94 °C -1 min	94 °C -1 min
	Anillamiento	55 °C -1 min	55 °C -1 min	50 °C -1 min	55 °C -2 min
	Elongación	72 °C -2 min	72 °C -2 min	72 °C -3 min	72 °C -1 min

Clonaje del gen *fda*.

El inserto *fda* procedente de la PCR, una vez purificado, se sometió a ligamiento con el vector pGEM-T Easy según el protocolo del fabricante. La construcción pGEM-*fda* así obtenida se utilizó para transformar células competentes DH5α que después se crecieron sobre placas de LB-agar que contenían 250 µg/mL de ampicilina. De las colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 5 al azar y se chequearon por PCR.

Las colonias positivas se crecieron en 5 mL de LB-ampicilina para purificar el plásmido. Estos plásmidos se secuenciaron usando los cebadores de secuenciación de los promotores SP6 y el de la T7-DNA polimerasa para comprobar la secuencia completa del gen *fda*.

Tabla 6. Secuencias de los oligos cebadores empleados para la amplificación por PCR de los fragmentos *fda*, *dhak-I*, *I-fda* y *dhak-I-fda*.

Fragmento	Extremo	Primers	Diana
<i>dhak-I</i>	NtNdhak	5'-ATATT CATATG TCTCAATTCTTTTTT-3'	<i>NdeI</i>
	CtFdhak	5'- <u>CTGGCCCTGGCCCTGGCCCAGCTCACTCTC</u> -3'	-
<i>I-fda</i>	CtScXfda	5'-TATT ACTCGAG TTAAGCTTTGTTTACTGA-3'	<i>XhoI</i>
	NtFScfda	5'- <u>CAGGGCCAGGGCCAGAACCAAGAACAATTTGACAAA</u> -3'	-
<i>dhak-I-fda</i>	NtNdhak	5'-ATATT CATATG TCTCAATTCTTTTTT-3'	<i>NdeI</i>
	CtScXfda	5'-TATT ACTCGAG TTAAGCTTTGTTTACTGA-3'	<i>XhoI</i>
<i>fda</i>	NtScNfda	5'-ATATT CATATG AACCAAGAACAATTTGAC-3'	<i>NdeI</i>
	CtScXfda	5'-TATT ACTCGAG TTAAGCTTTGTTTACTGA-3'	<i>XhoI</i>

Las bases señaladas **en negrita** se corresponden con las secuencias diana de los correspondientes enzimas de restricción.

Las bases subrayadas corresponden con la secuencia conectora.

Posteriormente, el gen *fda* se subclonó en el vector de expresión pET-28b(+) entre las dianas específicas de los enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. Así, tanto la construcción pGEM-*fda* como el plásmido pET-28b(+) se digirieron con dichos enzimas de restricción según las instrucciones del fabricante. Tanto el inserto correspondiente al gen *fda* como el vector de pET-28b(+) doblemente digeridos se purificaron de gel de agarosa al 0.8% en TAE. A continuación, se ligaron usando la T4 DNA ligasa con una relación vector/inserto 1:1. La mezcla de ligación de la construcción pET-*fda* así obtenida, se transformó en células competentes DH5 α que después se crecieron sobre placas de LB-agar que contenían 26.3 μ g/mL de kanamicina. De las colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 10 al azar, se chequearon por PCR y se conservaron a -80 °C.

Para la expresión de la proteína recombinante, la construcción pET-*fda* se transformó en células competentes BL21(DE3).

Sobreexpresión y purificación del enzima FBPA.

Para la sobreexpresión de la FBPA se seleccionó una de las colonias positivas que contenía el gen *fda* y se creció un cultivo del clon pET-fda/BL21 en medio LB según protocolo descrito en el apartado de “Metodologías Generales”.

La proteína recombinante FBPA se purificó en dos pasos a partir del extracto crudo de proteína soluble: i) cromatografía IMAC con elución por imidazol y ii) cromatografía de exclusión molecular.

Para el primer paso, la columna de resina de Ni⁺²-IDA-agarosa de alta densidad se lavó con 5 volúmenes de agua por cada volumen de resina y se equilibró con 10 volúmenes de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7.5. A continuación se cargó la columna con 1 volumen de CFE y se lavó con 20 volúmenes del mismo tampón. Para eluir la FBPA se utilizó 1 volumen de tampón fosfato 20 mM, imidazol 1M, pH 7.5.

Éste eluido así obtenido se sometió a un segundo paso de purificación por exclusión molecular. La fase móvil utilizada fue fosfato 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.2 con un flujo constante de 1.0 mL/min. Las fracciones de eluido que contienen la FBPA se mezclaron para dializar frente a agua a pH 7.5 y su posterior liofilizado.

Obtención de la proteína de fusión quinasa-L-aldolasa (DLF).

Diseño de la secuencia conectora de la proteína de fusión.

La secuencia conectora o brazo espaciador se diseñó con el programa LINKER (Crasto y Feng, 2000) y, de las posibles secuencias de aminoácidos, se optó por Gln-Gly-Gln-Gly-Gln. Así, la secuencia correspondiente en DNA es 5' CAGGGCCAGGGCCAG 3'.

Amplificación del fragmento de fusión dhak-I-fda.

El gen de fusión se construyó utilizando el método denominado “de los 4 primers”, mediante dos etapas de PCR consecutivas (Horton *et al.*, 1989).

1ª etapa: obtención de los fragmentos *dhak-I* y *I-fda*.

El DNA molde para la amplificación del fragmento *dhak-I* se obtuvo mediante purificación de plásmido de un cultivo O/N en LB-ampicilina de *E. coli* transformado con pRSET-dhak disponible en nuestro laboratorio (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004)

Como DNA molde para la amplificación del fragmento *I-fda* se utilizó el mismo DNA obtenido a partir de la cepa CECT 4491 de *S. carnosus* descrito anteriormente.

Ambas amplificaciones se realizaron en un volumen final de 10 μ L tras 25 ciclos de reacción. Las condiciones de amplificación se encuentran resumidas en la Tabla 5. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores están recogidas en la Tabla 6.

2ª etapa: obtención del fragmento de fusión *dhak-I-fda*.

Como molde de DNA del fragmento de fusión *dhak-I-fda* se utilizó una mezcla 1:1 de los productos de amplificación obtenidos en la primera etapa tras su purificación de gel de agarosa.

La amplificación se realizó en un volumen final de 10 μ L. La mezcla de reacción se sometió a 25 ciclos de amplificación. Las condiciones de reacción se encuentran resumidas en la Tabla 5. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores se encuentran recogidas en la Tabla 6.

Clonaje del gen de fusión *dhak-I-fda*.

El inserto *dhak-I-fda* purificado (2565 pb) procedente de la PCR y el plásmido pET-28b(+) se sometieron, por separado, a una doble digestión con los enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I según el protocolo estándar del fabricante. Tras la purificación se procedió al ligamiento del inserto *dhak-I-fda* en el vector doblemente digerido pET-28b(+) con la T4 DNA ligasa utilizando una relación vector/inserto 1:1. El vector de expresión pET-dhak-I-fda así construido se utilizó para transformar células competentes DH5 α que después se crecieron sobre placas de LB-agar que contenían 26.3 μ g/mL de kanamicina. De las

colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 7 al azar y se chequearon por PCR.

Las colonias que dieron positivo por PCR se crecieron en 5 mL de LB-kanamicina para purificar plásmido. Estos plásmidos se secuenciaron usando el cebador de secuenciación del promotor de la T7-DNA polimerasa. Además, para comprobar la secuencia completa del gen de fusión *dhak-l-fda* fue necesario utilizar 3 oligos de secuenciación diseñados específicamente para dicho propósito. La secuencia de estos tres oligos, pETSPCt, PSECFUS1 y PSECFUS2 se encuentra recogida en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencia de los oligos diseñados específicamente para la secuenciación del gen de fusión *dhak-l-fda*.

Nombre	Sentido	Primers
PSECFUS1	reverso	5'-CTGTCATCTGCCGCAAGAAGCCGA-3'
PSECFUS2	reverso	5'-CTCAACTTCACGGTCCATAGTTTG-3'
pETSPCt	reverso	5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

Uno de los plásmidos positivos pET-dhak-l-fda, se seleccionó para su transformación en células competentes de BL21(DE3) que después se crecieron sobre placas de LB-agar que contenían 26.3 µg/mL de kanamicina. De las colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 6 al azar y se chequearon por PCR.

Sobreexpresión y purificación del enzima de fusión DLF.

Para la sobreexpresión de la proteína de fusión se creció un cultivo de uno de los clones positivos pET-dhak-l-fda/BL21 en medio LB según el protocolo descrito en el apartado de “Metodologías Generales”.

La proteína de fusión DLF se purificó, al igual que la FBPA, en dos pasos a partir del extracto crudo de proteína soluble: i) cromatografía IMAC con elución por imidazol y ii) cromatografía de exclusión molecular. La única diferencia en la purificación de estas proteínas está en que la cromatografía de afinidad para

purificar la proteína de fusión tiene un paso intermedio extra de lavado previo a la elución. Este lavado se realizó con 10 volúmenes de tampón fosfato 20 mM, imidazol 50 mM, pH 7.5.

Ensayos de actividad.

Actividad fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa.

La valoración se realizó a temperatura ambiente en ensayos de 5 minutos en un volumen final de 1 mL en cubeta, conteniendo una cantidad conocida de enzima aldolasa (FBPA o DLF), Tris-HCl 40 mM, pH 8, 0.2 μ mol de NADH, 1 μ mol de fructosa-1,6-bisfosfato y 2 U de α -GDH/TIM.

Se define 1 unidad de actividad aldolasa como la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de fructosa-1,6-bisfosfato en dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato por minuto en las condiciones mencionadas.

Actividad dihidroxiacetona quinasa.

El ensayo para la determinación de la actividad quinasa del enzima de fusión DLF se realizó en las mismas condiciones descritas para la determinación de la actividad quinasa de la proteína nativa DHAK.

Dicroísmo circular.

Los espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano de las distintas proteínas se realizaron a 20 °C en la región entre 240-195 nm, con un paso óptico de 0.1 nm. Para cada espectro se tomaron 4 acumulaciones que se promediaron automáticamente. Cada espectro se realizó con una velocidad de barrido de 20 nm/min. y un ancho de banda de 0.2 nm.

Los estudios de DC a temperatura variable se realizaron a $\lambda=222$ nm, con un paso óptico de 0.1 nm y en un rango de temperatura entre 20 - 90 °C. La toma de datos se hizo cada 0.2 °C y con un gradiente de temperatura de 40 °C/h.

Las muestras de DHAK tenían una concentración 0.2-0.4 mg/mL (3.1-6.2 μ M) en agua a pH 7.5. Las muestras de FBPA tenían una concentración 0.1-0.2

mg/mL (2.9-5.8 μ M) en agua a pH 7.5. Las muestras de DLF tenían una concentración 0.6-0.7 mg/mL (6.4-7.5 μ M) en agua a pH 7.5.

Determinación de parámetros cinéticos.

Las determinaciones de velocidades iniciales de los ensayos cinéticos se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen total de 0.3 mL. Las mezclas de reacción se escalaron respecto a los ensayos de actividad manteniendo las concentraciones de enzimas y sustratos.

Los datos para la obtención de los parámetros cinéticos fueron tratados con el módulo SigmaPlot EnzymeKinetics 1.10 del programa SigmaPlot 8.0.

Determinación de los parámetros cinéticos respecto a la DHA

La medida de los parámetros cinéticos respecto a la DHA se realizó con 24 μ g/mL de DLF purificada y 12 concentraciones distintas de DHA en el rango comprendido entre 0.83-16.7 μ M con concentraciones saturantes del complejo $[\text{MgATP}]^{2-}$ (3.75 mM).

Determinación de los parámetros cinéticos respecto a la FBP

La medida de los parámetros cinéticos respecto a la fructosa-1,6-bisfosfato se realizó con 5.3 μ g/mL de proteína purificada y 16 concentraciones distintas de FBP en el rango comprendido entre 0.005-0.25 mM para la proteína de fusión DLF y 0.83 μ g/mL de proteína purificada y 20 concentraciones distintas de FBP en el rango comprendido entre 0.005-0.6 mM para la FBPA.

Estudio del “efecto de proximidad” de los centros activos en el enzima de fusión.

Para estudiar el efecto de proximidad de los centros activos que genera la fusión sobre la velocidad de la reacción, se llevaron a cabo reacciones en paralelo utilizando el sistema multienzimático DHAK/FBPA o el sistema simplificado DLF. En ambos casos, las condiciones de reacción fueron

idénticas y se pusieron las mismas unidades de actividad quinasa y aldolasa en los dos conjuntos de reacciones.

Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente en 1.5 mL de tampón fosfato 20 mM, pH 7.5 conteniendo 0.05 mmol de DHA, 0.15 mmol de benciloxiacetaldehído (**8**), 12.5 μmol de MgSO_4 y 12.5 μmol de ATP.

En cada pareja de ensayos DHAK/FBPA frente a DLF se pusieron las mismas unidades de actividad quinasa y aldolasa (1-1.5 U quinasa y 3-4.5 U aldolasa), con una relación 1:3 quinasa:aldolasa fijada por la construcción del enzima de fusión.

Aplicación sintética del enzima de fusión DLF para la reacción aldólica a partir de DHA y un aldehído.

Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente en 1.5 mL de tampón fosfato 20 mM, pH 7.5 conteniendo 0.05 mmol de DHA, 0.150 mmol de aldehído, 0.1 mmol de acetilfosfato, 12.5 μmol de MgSO_4 , 3 U de AK, y DLF (1.5-2 U de quinasa y 3-6 U de aldolasa). Las reacciones se inician con la adición de 3.4 μmol de ATP.

Para estas reacciones se utilizaron como sustratos acetaldehído (**2**), benciloxiacetaldehído (**8**) y 3-(metiltio)propionaldehído (**9**).

Determinación estructural mediante Resonancia Magnética Nuclear.

Se realizaron espectros de resonancia de los distintos reactivos de partida utilizados en el sistema multienzimático simplificado DLF. Para la caracterización de los productos finales se utilizaron los crudos de reacción. Esos crudos se pasaron por C-activo y, a continuación, se liofilizaron antes de resuspenderlos en el disolvente deuterado (Dinkelbach *et al.*, 2001).

Espectroscopia de ^1H -RMN.

Todos los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) se realizaron en un espectrómetro Varian de 500 MHz. En cada caso, junto al disolvente deuterado y la temperatura a la que se realizó el espectro, está

indicada la frecuencia en la que está registrado el mismo. También se indican los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; q, quintuplete; m, multiplete), el número de protones (deducidos por integración), el valor de las constantes de acoplamiento J (Hz) y la asignación estructural.

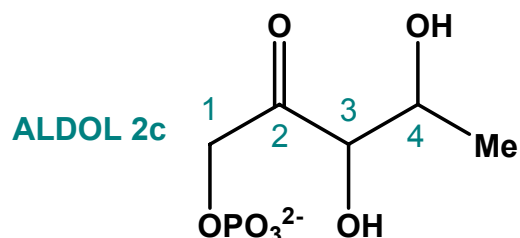
Espectroscopia de ^{13}C -RMN.

Todos los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C -RMN) se realizaron en un espectrómetro Varian-500 (125 MHz). En cada caso se indican los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm) y la asignación estructural.

Espectroscopia de RMN bidimensional.

Los experimentos COSY, HMQC, HMBC y NOESY se realizaron en un espectrómetro Varian de 500 MHz.

Caracterización de los aldoles **2c**, **8c** y **9c**.

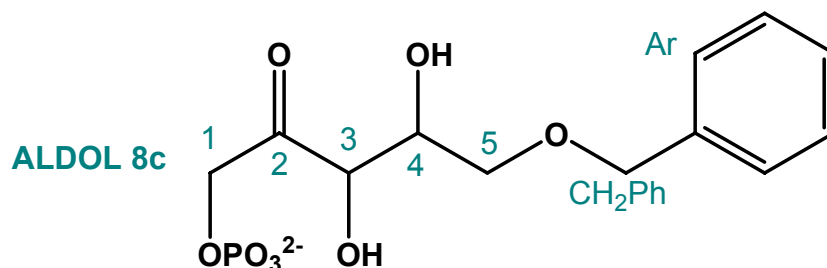


ALDOL 2c: 1-*o*-fosfono-5-desoxi-*D*-treo-pent-2-ulososa

(1-*o*-fosfono-5-desoxi-*D*-xilulosa).

^1H RMN (500 MHz, D_2O , 298 K): δ 4.55 (dd, 1H, $J = 18.8, 6.1$ Hz, H-1_A), 4.45 (dd, 1H, $J = 18.8, 6.1$ Hz, H-1_B); 4.20 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, H-3); 4.14 (dq, 1H, $J = 6.4, 2.4$ Hz, H-4), 1.10 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz, Me).

^{13}C RMN (125 MHz, D_2O , 298 K): δ 211.6 (C-2), 78.5 (C-3), 67.9 (C-4), 67.7 (C-1), 18.4 (Me).

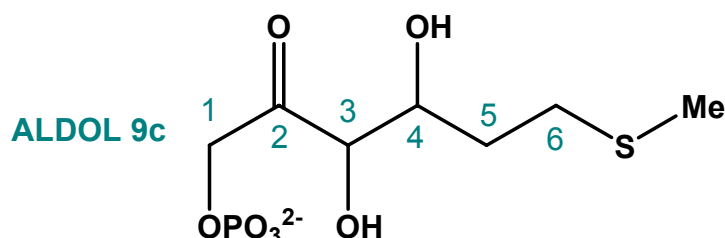


ALDOL 8c: 5-*o*-bencil-1-*o*-fosfono-*D*-treo-pent-2-ulososa

(5-*o*-bencil-1-*o*-fosfono-*D*-xilulosa).

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, D_2O , 298 K): δ 7.2-7.1 (m, 5H, Ar), 4.52 (dd, 1H, $J = 18.5, 5.8$ Hz, H-1_A), 4.40 (dd, 1H, $J = 18.5, 5.8$ Hz, H-1_B); 4.4-4.3 (m, 2H, CH_2Ph), 4.1-4.0 (m, 1H, H-3), 3.5-3.4 (m, 1H, H-4), 3.5-3.4 (m, 1H, H-4), 3.27 (d, 2H, $J = 4.9$ Hz).

$^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, D_2O , 298 K): δ 212.3 (C-2), 129.5 (Ar), 129.3 (Ar), 128.9 (Ar), 128.6 (Ar), 75.5 (C-1); 73.1 (C-5); 72.4 (CH_2Ph); 70.5 (C-4); 70.2 (C-3).



ALDOL 9c: 5-desoxi-1-*o*-fosfono-6-*S*-metil-6-tio-*D*-treo-hex-2-ulososa

(5-desoxi-1-*o*-fosfono-6-*S*-metil-6-tio-*D*-fructosa).

$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, D_2O , 298 K): δ 4.55 (dd, 1H, $J = 18.8, 6.6$ Hz, H-1_A), 4.45 (dd, 1H, $J = 18.8, 6.6$ Hz, H-1_B); 4.28 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-3); 4.05 (ddd, 1H, $J = 14.4, 11.5, 9.2$ Hz, H-4), 2.5-2.4 (m, 2H, H-6), 1.95 (s, 3H, Me), 1.8-1.7 (m, 2H, H-5).

$^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, D_2O , 298 K): δ 211.5 (C-2), 77.7 (C-3), 70.4 (C-4), 68.1 (C-1), 29.6 (C-6), 23.5 (C-5); 14.3 (Me).

RESULTADOS

A. Sistema multienzimático acoplado para la formación estereoselectiva de enlaces C-C.

La parte inicial de este trabajo se ha enfocado hacia la extensión del sistema multienzimático previamente descrito por nuestro grupo (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004), ampliando la diversidad estructural de los aldehídos empleados como sustrato y haciéndolo extensivo a otras aldolasas dependientes de DHAP. Uno de los principales problemas de la utilización de aldolasas dependientes de DHAP es que, salvo RAMA, no están disponibles comercialmente. Así, como primer paso, se procedió a la obtención de los enzimas Rham1PA y Fuc1PA de *E. coli*.

Los genes *rhaD* y *fucA* de *E. coli*, codificantes de la proteínas Rham1PA y Fuc1PA respectivamente, se amplificaron de manera específica mediante PCR y se clonaron en el vector de expresión pET-28b(+) utilizando como hospedador la cepa BL21(DE3) de *E. coli* (Fig. 23). En ambos casos se comprobó que la secuencia del gen introducido era la esperada (García-Junceda *et al.*, 1995).

La expresión de proteínas inducida por IPTG nos permitió, en ambos casos, una sobreexpresión de la aldolasa recombinante en la fracción de proteína soluble superior al 75% de proteína total (Fig. 24).

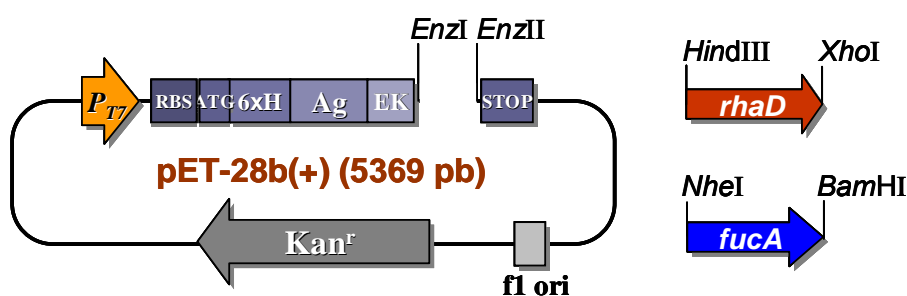


Figura 23. Esquema de las construcciones pET-rhaD y pET-fucA

La purificación de ambas proteínas por IMAC con elución mediante cambio de pH nos permitió obtener una productividad final de 132 U (750 mg) de Rham1PA pura por litro de cultivo y 165 U (750 mg) de Fuc1PA pura por litro de cultivo.

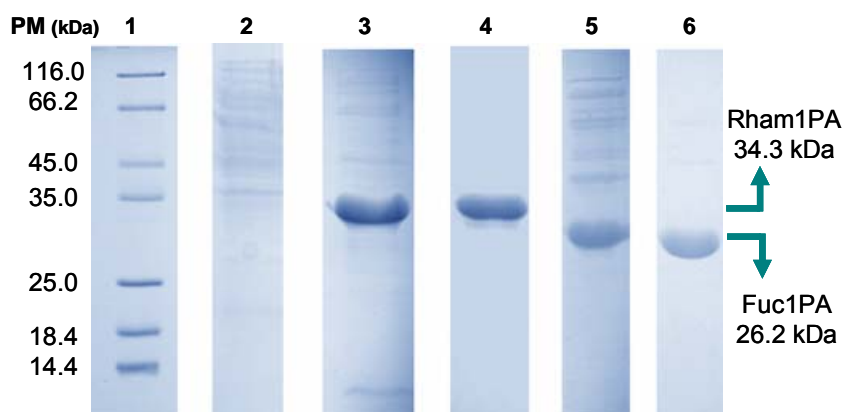


Figura 24. SDS-PAGE de la sobreexpresión y purificación de los enzimas Rham1PA y Fuc1PA. La figura es una composición de varios geles del mismo porcentaje de acrilamida/bisacrilamida. **(1)** Marcador de pesos moleculares; **(2)** Blanco de expresión de una cepa de *E. coli* BL21 transformada con pET-28b(+); **(3)** Sobreexpresión de la Rham1PA; **(4)** Purificación de la Rham1PA por IMAC; **(5)** Sobreexpresión de la Fuc1PA; **(6)** Purificación de la Fuc1PA por IMAC.

De manera paralela a los trabajos con Rham1PA y Fuc1PA, en nuestro grupo se estaban realizando estudios del sistema multienzimático con RAMA (Sánchez-Moreno *et al.*, 2008a). Al ensayar la reacción con el *trans*-cinamaldehído (ald. 11, Tabla 4) obtuvimos una formación de aldol del 79% respecto a la DHA en 7h. Sin embargo, la caracterización por RMN del aldol obtenido no mostró las señales correspondientes al anillo aromático y sólo permitió detectar como producto mayoritario la inesperada formación de

fructosa-1,6-bisfosfato (Gray y Barker, 1970). Está descrito en bibliografía (Dinkelbach *et al.*, 2001) que la aplicación de las aldolasas dependientes de DHAP es muy sensible a la presencia de contaminación por triosafosfato isomerasa (TIM) ya que este enzima cataliza la isomerización de la DHAP a D-G3P (Fig. 25). Este aldehído puede ser sustrato de la aldolasa y dar lugar a la formación de un aldol no deseado. En nuestro sistema, la formación de fructosa-1,6-bisfosfato sólo se podía explicar por una contaminación de alguna preparación enzimática con TIM.

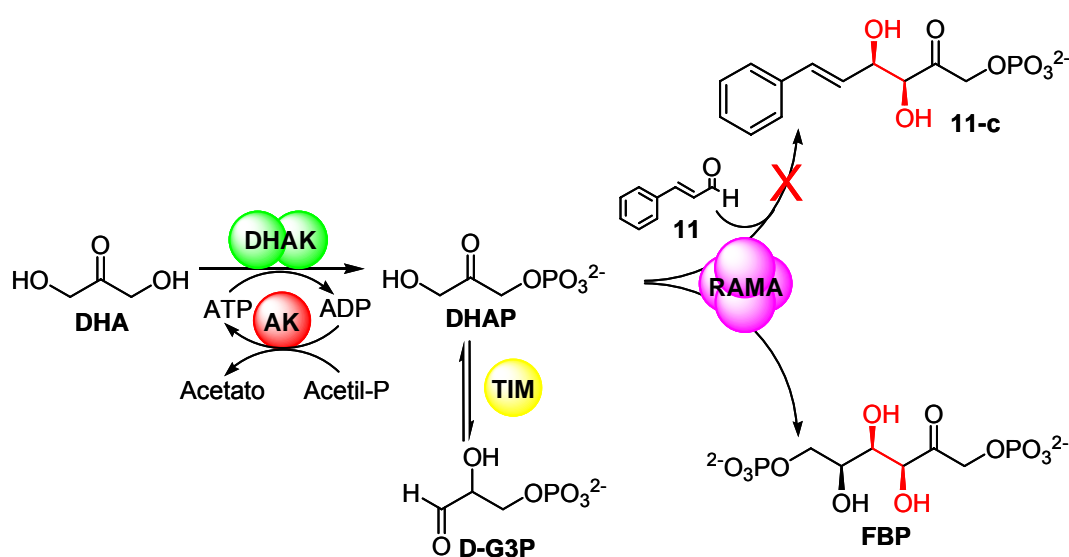


Figura 25. Reacción enzimática de formación de fructosa-1,6-bisfosfato.

En un principio, nosotros habíamos descartado la contaminación de TIM en las purificaciones de las distintas enzimas utilizadas, ya que en ningún momento se detectaron bandas de proteína en los geles de SDS-PAGE a 27 kDa (Fig. 24 y 26), correspondiente al peso del monómero de TIM de *E. coli* (Riley *et al.*, 2006). Así, fue necesario realizar distintos ensayos de control para determinar el origen de la contaminación por TIM en nuestro sistema. En las incubaciones de 50 μmol de DHAP en tampón HEPES 20 mM, pH 6.8 en presencia de 10 U de RAMA con y sin 6 U de AK no se detectó la presencia de aldol, lo que permitió descartar la contaminación en los enzimas comerciales. En las incubaciones de 50 μmol de DHAP en tampón HEPES 20 mM, pH 6.8 en presencia de 10 U de RAMA con 1.5 U de DHAK se detectó la formación de

aldol en 2.5 h. De esta forma, se pudo determinar que el origen de la contaminación por TIM estaba en la preparación de la DHAK. Hasta ese momento, la DHAK se purificaba en un único paso por IMAC con elución con imidazol, pero a partir de este punto se incluyó un segundo paso de purificación por exclusión molecular (Sánchez-Moreno, comunicación personal). La repetición de los controles de contaminación por TIM con la DHAK purificada mediante este nuevo protocolo permitió comprobar la eliminación de dicha contaminación.

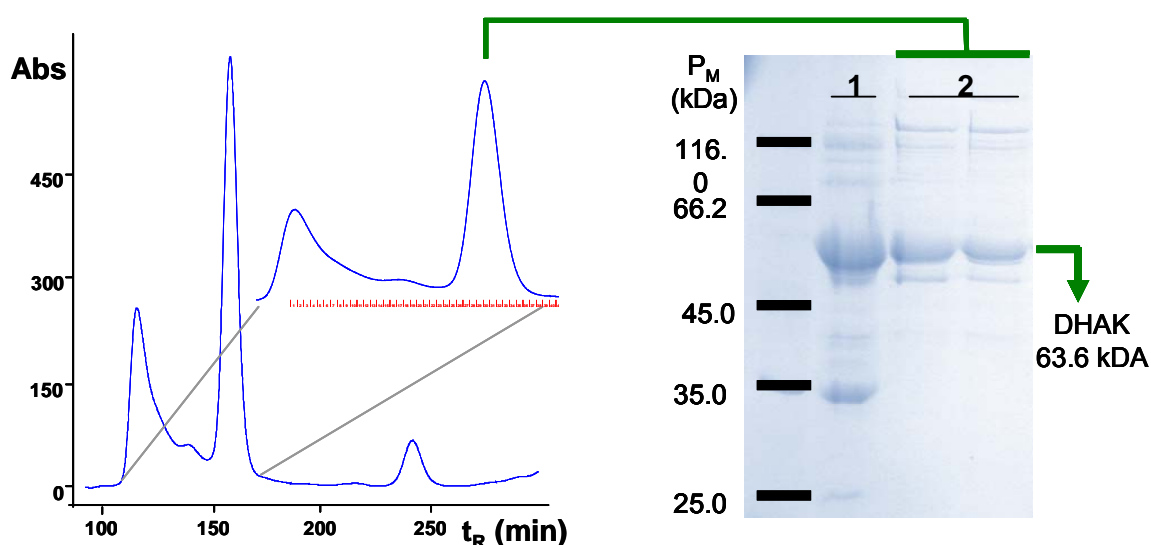


Figura 26. Purificación de la DHAK. (1) Primer paso de purificación por IMAC. (2) Segundo paso de purificación por exclusión molecular.

Del mismo modo, como paso previo a la aplicación de Rham1PA y Fuc1PA en el sistema multienzimático se realizaron controles para determinar la posible presencia de TIM como contaminante de las proteínas purificadas. Es importante destacar que, en ninguna de las preparaciones enzimáticas después de la purificación por IMAC (DHAK, Rham1PA, Fuc1PA) se detectaba una banda de 27 kDa en los geles de SDS-PAGE debida a la TIM de *E. coli* (Fig. 24 y 26). Para realizar estos controles se incubaron 50 μ mol de DHAP en tampón HEPES 20 mM, pH 6.8 en presencia de 1 U de aldolasa (Rham1PA o Fuc1PA) en ausencia de aldehído. La no-detección de aldol durante el tiempo de incubación descarta una posible contaminación por TIM en las aldolasas

purificadas o, al menos confirma que si existe esta contaminación, el posible D-gliceraldehído-3-fosfato formado no es sustrato de las aldolasas ensayadas.

Una vez que dispusimos de todos los componentes necesarios para el estudio del sistema multienzimático, se procedió a la optimización de la relación aldolasa/DHAK para minimizar la acumulación de DHAP en el medio de reacción.

Una de las principales características del sistema multienzimático acoplado objeto de estudio es que la formación de la DHAP debe tener lugar a la misma velocidad a la que es consumida por la aldolasa. Para ello deben tenerse en cuenta dos aspectos: (i) el pH debe mantenerse a pH 7.5 mediante ajuste continuo del mismo para asegurar el funcionamiento del sistema de regeneración de ATP y (ii) la relación entre las actividades aldolasa/DHAK debe ajustarse experimentalmente para prevenir la acumulación de DHAP y así minimizar su degradación al pH neutro en el que se desarrolla la reacción. Así, la relación de actividades Rham1PA/DHAK se determinó empíricamente. La relación óptima de actividades para el sistema Fuc1PA/DHAK fue 1/1.5 cuando se utiliza L-lactaldehído como sustrato (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004). Cuando se ensayó esta misma relación con la Rham1PA y el mismo aldehído no se detectó acumulación de DHAP durante el transcurso de la reacción. Para asegurarnos de que la formación de la DHAP no estaba siendo el paso limitante de la reacción, se incrementó la cantidad de DHAK a 1.7 unidades. En estas condiciones pudimos observar una pequeña acumulación de DHAP, inferior al 5%, acompañada de un ligero aumento en la formación del aldol correspondiente. Así, decidimos considerar 1/1.7 como la relación óptima para las reacciones que utilizan Rham1PA como aldolasa.

Estudio de la aplicabilidad sintética del sistema multi-enzimático acoplado para la síntesis de enlaces C-C.

El estudio de la aplicabilidad sintética del sistema multienzimático se realizó mediante el ensayo de dicho sistema con los enzimas Rham1PA y Fuc1PA y 13 aldehídos representativos de una amplia diversidad estructural cuyas estructuras se encuentran recogidas en la figura 27.

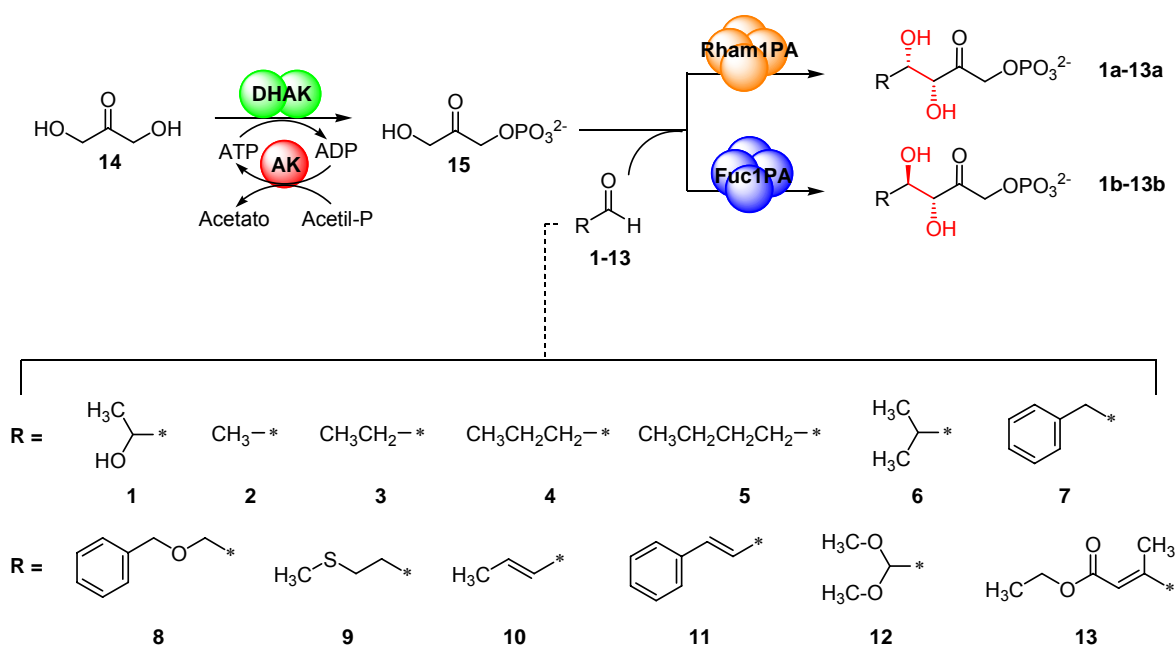


Figura 27. Sistema multienzimático acoplado para la formación de enlaces C-C mediante reacción aldólica entre DHAP, generada *in situ* por fosforilación de DHA, y distintos aldehídos, catalizada por dos aldolasas dependientes de DHAP.

Reacciones en un único paso (*one-pot/one-step*).

Como primera aproximación, el sistema multienzimático se ensayó en una estrategia en un solo paso. Esta estrategia incluye desde el principio todos los componentes de la reacción enzimática en el medio de reacción, tanto los necesarios para la fosforilación de DHA como los necesarios para la reacción aldólica (Fig. 28). Los resultados obtenidos, que se encuentran resumidos en la

Tabla 8 para la Rham1PA y en la Tabla 9 para la Fuc1PA, se pueden agrupar en 3 categorías:

1). Aquellos en los que el sistema de fosforilación de la DHA funcionó correctamente, con un consumo de DHA entre el 95% y el 100%, y el porcentaje de formación de aldol fue de moderado a bueno (rendimiento superior al 25%). A esta categoría pertenecen las reacciones con los aldehídos **1, 5, 9 y 12** catalizadas por Rham1PA y las reacciones con los aldehídos **1-3, 5, 6 y 12** catalizadas por Fuc1PA.

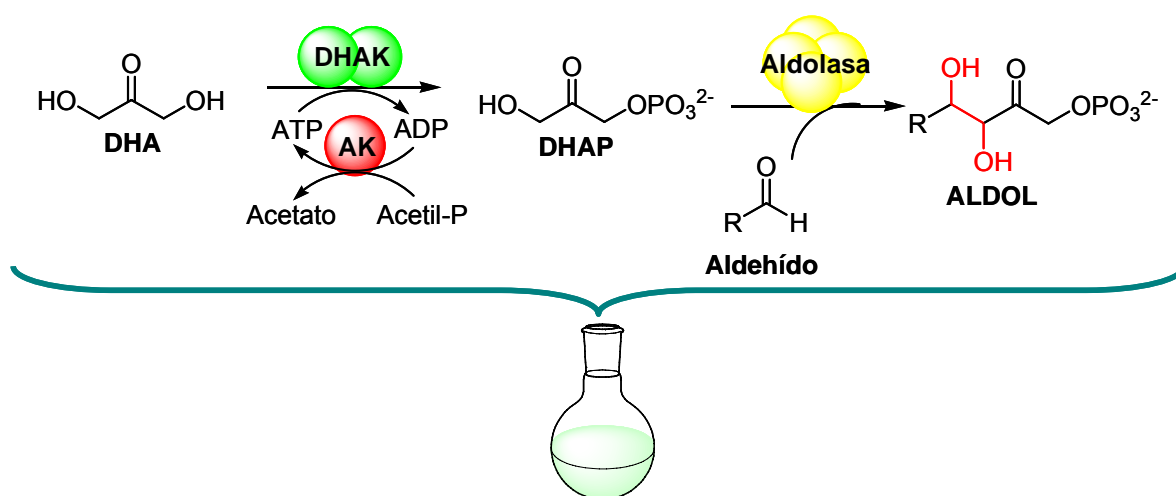


Figura 28. Representación esquemática de la estrategia en un paso (one-pot/one step).

2). Aquellos donde la fosforilación de la DHA fue casi completa (95-100%) pero el rendimiento de formación de aldol fue de moderado a pobre (inferior al 25%). A esta categoría pertenecen las reacciones con los aldehídos **3, 6, 8, 10 y 13** catalizadas por Rham1PA, mientras que ninguna de las reacciones catalizadas por Fuc1PA se pudo encuadrar en esta categoría.

3). Aquellos donde la fosforilación de DHA fue inferior al 90% o incluso donde no tuvo lugar. A esta categoría pertenecen las reacciones con los aldehídos **2, 4, 7 y 11** catalizadas por Rham1PA y las reacciones con los aldehídos **4, 7-11 y 13** catalizadas por Fuc1PA.

Los resultados de la segunda categoría, donde el sistema de fosforilación funcionó correctamente pero los rendimientos de formación de aldol fueron

bajos, pueden ser debidos a que estos aldehídos sean pobres sustratos de la Rham1PA. Por otro lado, en los resultados de la tercera categoría, no sabemos si esos aldehídos son buenos sustratos o no, ya que lo que no ha funcionado ha sido el sistema de fosforilación. El no funcionamiento del sistema de fosforilación puede estar motivado por una interferencia de los propios aldehídos o de algún otro componente del medio de reacción con el sistema multienzimático, inhibiendo y/o inactivando a la DHAK o a la AK.

Tabla 8. Resultados del sistema multienzimático utilizando Rham1PA.

Aldehído	Estrategia en un paso		Estrategia en dos pasos	
	1a-13a [%]	Conversión DHA [%]	1a-13a [%]	Conversión DHA [%]
1	83.0	95.0	-	-
2	61.3	67.8	65.0	98.9
3	7.6	97.2	6.7	98.5
4	13.0	75.3	29.7	99.0
5	61.0	98.3	-	-
6	8.0	98.0	19.8	99.0
7^[a]	5.0	9.6	49.5	99.0
8^[b]	11.0	99.0	31.7	99.0
9	39.0	96.0	-	-
10	7.0	98.5	27.5	98.5
11^[c]	5.6	76.2	9.9	99.0
12	54.0	99.0	-	-
13	15.0	97.7	61.9	98.5

[a] El benzaldehído comercial se encuentra en una dilución al 50% en alcohol bencílico, lo que resulta en una concentración final en el medio de reacción del 3.3%.

[b] 10% DMSO.

[c] 5% DMSO.

Por ejemplo, la presencia del alcohol bencílico en la mezcla de reacción del aldehído **7** o el uso de DMSO como cosolvente con los aldehídos **8** y **11** podría justificar los resultados obtenidos con estos compuestos.

Buscando mejorar los resultados de las reacciones pertenecientes a esta tercera categoría, decidimos ensayar una estrategia de reacción en dos pasos.

Tabla 9. Resultados del sistema multienzimático utilizando Fuc1PA.

Aldehído	Estrategia en un paso		Estrategia en dos pasos	
	1b-13b [%]	Conversión DHA [%]	1b-13b [%]	Conversión DHA [%]
1	88.8	94.9	-	-
2	73.0	97.6	-	-
3	28.5	97.8	-	-
4	10.8	27.7	13.0	97.9
5	27.3	93.2	-	-
6	26.8	98.5	-	-
7^[a]	0.0	0.0	19.4	97.9
8^[b]	15.0	55.3	13.0	97.9
9	5.0	5.0	30.0	97.9
10	11.0	57.4	16.0	94.4
11^[c]	9.8	26.8	7.0	97.9
12	93.6	98.6	-	-
13	21.0	48.7	17.0	97.9

[a] El benzaldehído comercial se encuentra en una dilución al 50% en alcohol benzílico, lo que resulta en una concentración final en el medio de reacción del 3.3%.

[b] 10% DMSO.

[c] 5% DMSO.

Reacciones en dos pasos (one-pot/two-steps).

En la estrategia en dos pasos, al comienzo de la reacción sólo están presentes los componentes necesarios para la fosforilación enzimática de la DHA incluyendo el sistema de regeneración de ATP. De esta forma, se permite la acumulación de DHAP en el medio de reacción. Cuando la fosforilación de la DHA supera el 90%, el pH se acidifica hasta 6.8 y se añaden el aldehído, la

aldolasa y el Zn^{+2} para que, en un segundo paso, tenga lugar la adición aldólica.

Los resultados obtenidos con Rham1PA se encuentran resumidos en la Tabla 8 y los obtenidos con Fuc1PA en la Tabla 9.

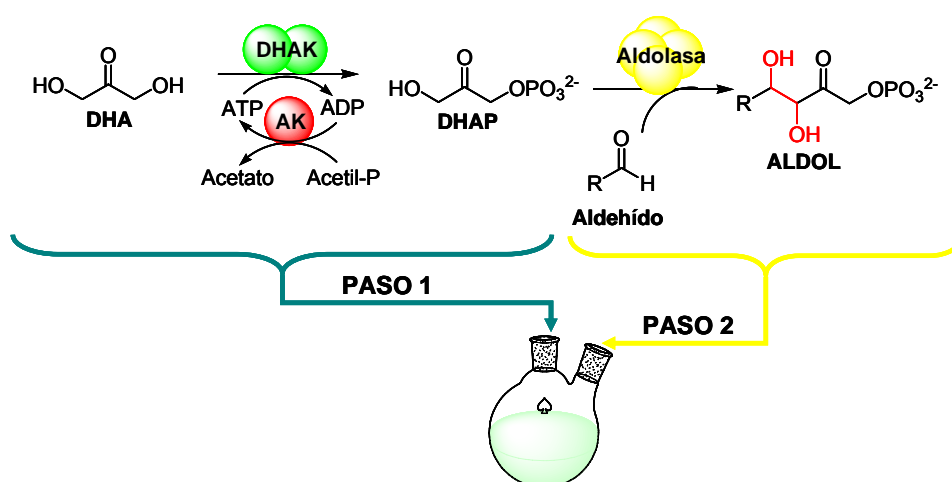


Figura 29. Representación esquemática de la estrategia en dos pasos (one-pot/two steps).

El uso de esta estrategia en dos pasos nos permitió recuperar la funcionalidad del sistema multienzimático y, en la mayoría de los casos, se observó un aumento en la formación de aldol. Por ejemplo, en la reacción catalizada por la Rham1PA con el aldehído **4** como aceptor, la formación del aldol aumentó del 13% al 30%. En el caso de la reacción catalizada por la Fuc1PA con el aldehído **9** la formación de aldol pasó del 5% al 30%. También es destacable el resultado obtenido con el aldehído **7** como aceptor, donde la estrategia en un paso no funcionó con ninguna de las dos aldolasa mientras la estrategia en dos pasos dio una formación de aldol del 49.5% con Rham1PA y del 19.4 % con la Fuc1PA. En estas reacciones, en las que la estrategia en un único paso no era viable, la nueva estrategia en dos pasos permitió una notable mejora en la formación de aldol.

Inicialmente, esta estrategia se pensó para su aplicación únicamente a los aldehídos cuyas reacciones pertenecían a la tercera categoría, pero a la vista de las mejoras obtenidas, decidimos aplicarla también a las reacciones de la segunda categoría. En este caso, también se observó un aumento en la

formación de aldol. Por ejemplo, la reacción catalizada por la Rham1PA con el aldehído **13** como aceptor tuvo un incremento de formación de aldol del 15% al 62%. Con los aldehídos **8** y **10** los rendimientos de formación de aldol también aumentaron significativamente, en ambos casos el sistema en un paso generó un 10% de aldol que se vio incrementado al 32% y el 27.5%, respectivamente, con la estrategia en dos pasos. Estos resultados pueden ser debidos a la elevada concentración de DHAP en el medio de reacción, lo que puede conllevar un aumento en la velocidad de reacción.

De los resultados presentados podemos concluir que el sistema multienzimático acoplado para la síntesis de enlaces C-C objeto de estudio en esta Tesis es un método robusto y de amplia aplicabilidad. No sólo es aplicable con diferentes aldolasas dependientes de DHAP y aldehídos de gran diversidad estructural, sino que la adaptación del sistema a las estrategias en uno o dos pasos le confiere una gran flexibilidad. Gracias a ello es posible su utilización bajo diversas condiciones de reacción, como por ejemplo el uso de cosolventes o de aldehídos que afecten a la actividad quinasa o que sean pobres sustratos de la aldolasa.

B. Enzima de fusión dihidroxiacetona quinasa – fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa.

Una vez demostrada la versatilidad del sistema multienzimático descrito en el apartado anterior, nos planteamos el reto de conseguir su simplificación. La necesidad de trabajar con tres enzimas, con lo que esto supone tanto en materia de costes como desde un punto de vista operacional, puede representar un problema para su posible aplicación industrial (Asenjo y Andrews, 2008). La obtención de un enzima bifuncional quinasa-aldolasa permitiría tener ambas funciones en una única cadena polipeptídica,

abaratando costes y simplificando la aplicación del sistema multienzimático. Además, la proximidad entre los centros catalíticos de la proteína de fusión puede verse reflejada en un aumento en la velocidad de la reacción global respecto a la reacción con los enzimas independientes (James y Viola, 2002).

Diseño y obtención del enzima bifuncional quinasa-aldolasa.

Diseño del enzima bifuncional quinasa-aldolasa.

A la hora de diseñar un enzima de fusión resulta crítica la elección, tanto de los distintos elementos que formarán parte de la proteína quimérica como el orden en el que estos van a ser fusionados.

Como componentes de esta enzima bifuncional fue necesario seleccionar una dihidroxiacetona quinasa, una aldolasa dependiente de DHAP y una secuencia espaciadora.

Para la función quinasa se seleccionó la dihidroxiacetona quinasa de *C. freundii* CECT 4626, ampliamente estudiada en nuestro grupo de investigación y disponible en nuestro laboratorio y que había demostrado ya su utilidad sintética en el sistema multienzimático (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004). El gen *dhak* de *C. freundii* CECT 4626 se encuentra clonado en nuestro laboratorio en el vector de expresión pRSET-A (Fig. 30). La proteína DHAK se sobreexpresa por inducción con IPTG, representando el 56% del total de la proteína soluble. La productividad del sistema de expresión es de 3195 U de actividad quinasa por litro de cultivo. Por otra parte, esta DHAK presenta una constante de especificidad k_{cat}/K_M para la DHA de $1.19 \times 10^6 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, el valor más alto descrito en bibliografía para una DHAK (Sánchez-Moreno *et al.*, 2008b).

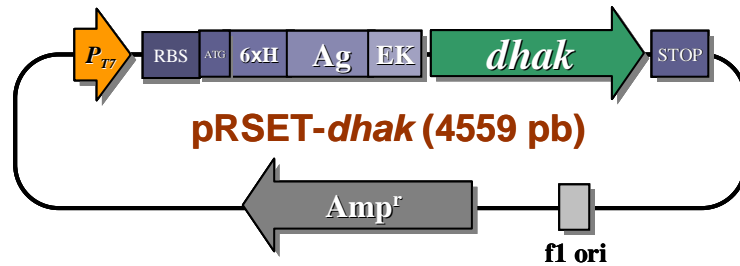


Figura 30. Esquema de la construcción pRSET-dhak.

La DHAK de *C. freundii* DSM 30040¹ ha sido cristalizada y su estructura es conocida (Siebold *et al.*, 2003). Esta proteína está formada por dos subunidades idénticas. Cada subunidad presenta dos dominios estructuralmente independientes, un dominio K (N-terminal) donde se encuentra el sitio de unión de la DHA y un dominio L (C-terminal) donde se localiza el sitio de unión al ATP (Fig. 31). Estos dos dominios están conectados por una secuencia espaciadora. Los monómeros están orientados de manera que los dominios K y L de cada subunidad se encuentran enfrentados (Fig. 31). El dominio de unión al ATP presenta un plegamiento único entre las quinasas (Cheek *et al.*, 2005) consistente en 8 α -hélices antiparalelas formando un bolsillo que incluye un fosfolípido fuertemente enlazado. Este fosfolípido mantiene la cabeza orientada hacia el exterior del bolsillo y se ha demostrado que no es esencial para la actividad de la quinasa.

¹ Actualmente esta cepa está listada en el catálogo DSMZ bajo la especie *C. braakii*.

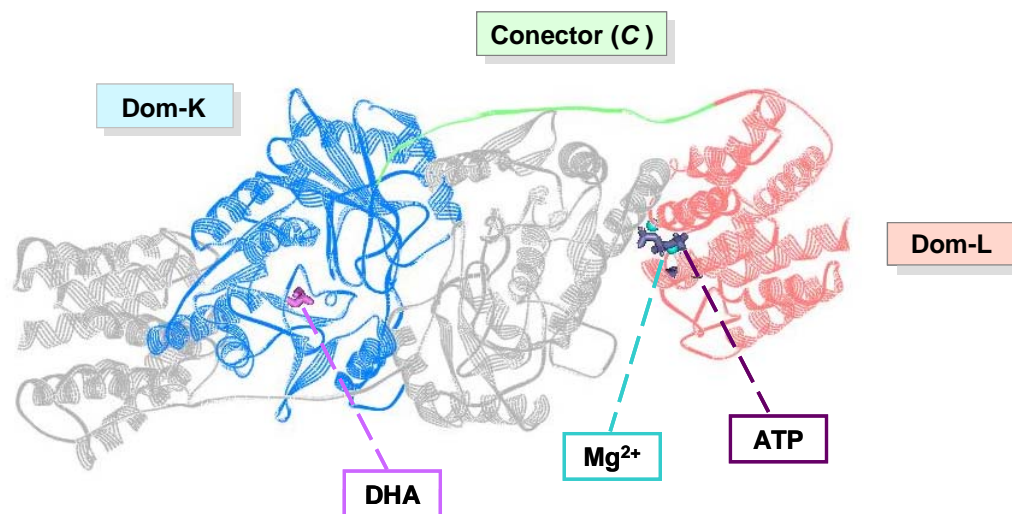


Figura 31. Estructura cristalográfica de la DHAK de *C. freundii* DSM 30040. Una de las subunidades está representada en gris y la otra en color.

Para la función aldolasa se seleccionó la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *S. carnosus*. Se trata de una proteína monomérica (Brockamp y Kula, 1990a) y precisamente se seleccionó por esta razón. Como discutiremos más adelante, las aldolasas dependientes de DHAP suelen ser diméricas o tetraméricas y su fusión directa con una proteína dimérica como la quinasa seleccionada puede dar lugar a agregados macromoleculares inactivos (Bülow y Mosbach, 1991). Por otro lado, este enzima ya ha sido descrito en bibliografía (Brockamp y Kula, 1990a) como una proteína muy estable frente al pH y la temperatura. Kula y colaboradores postulan que ambas estabilidades son efecto de su estructura monomérica y de una elevada capacidad de renaturalización. Además es una aldolasa de tipo I, lo que nos permite eliminar el metal divalente del medio de reacción. También tuvimos en cuenta que *Staphylococcus carnosus* es un organismo no patógeno.

Para el diseño de la secuencia conectora se utilizó el programa LINKER (Crasto y Feng, 2000), que, en el momento en el que se diseñó la construcción de esta proteína, se encontraba disponible on-line (Xue *et al.*, 2004). Para ello introdujimos como restricciones el número de aminoácidos de las proteínas a fusionar (600 la DHAK y 316 la FBPA), el número de aminoácidos de la secuencia conectora, la ausencia de aminoácidos cargados, polares, hidrofóbicos voluminosos o que pudieran formar puentes disulfuro (cys). De las

tres secuencias propuestas por el programa que cumplían los requisitos (Fig. 32), se seleccionó el conector Gln-Gly-Gln-Gly-Gln por varias razones: (i) la correspondiente secuencia de DNA no introduce sitios de corte para las enzimas seleccionadas para la clonación (*XhoI* y *NdeI*); (ii) se trata de una secuencia muy flexible que esperamos que genere una estructura de random coil y que permita el correcto plegamiento independiente de las dos funciones; (iii) es una secuencia corta que esperamos que facilite la proximidad entre los centros activos de ambas funciones enzimáticas, ayudando a que la concentración efectiva de la DHAP en el entorno de la aldolasa sea alta, favoreciendo la reacción.

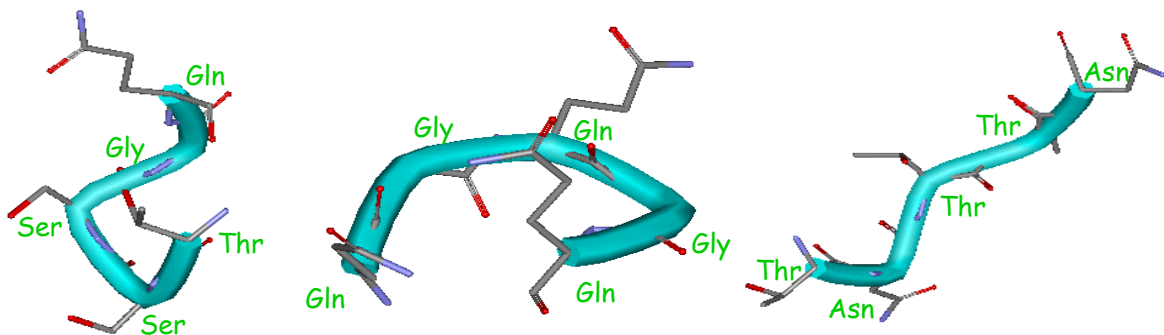


Figura 32. Estructura de las tres secuencias conectoras propuestas por el programa LINKER. La estructura 3D es la que adoptan estas secuencias en sus correspondientes proteínas de origen.

Como se ha comentado anteriormente, la DHAK de *C. freundii* DSM 30040 presenta un plegamiento en el extremo C-terminal con un bolsillo hidrofóbico. En este bolsillo se encuentra fuertemente unido un fosfolípido que, sin embargo, no es esencial para la actividad quinasa (Siebold *et al.*, 2003), lo que puede indicar cierta flexibilidad en el plegamiento de este extremo. Esta posible flexibilidad en el plegamiento nos decidió a realizar la fusión por el extremo C-terminal de la quinasa.

Aunque no se dispone de la estructura cristalográfica de la FBPA de *S. carnosus*, estudios de homología han permitido predecir una estructura similar a la de otras fructosa-1,6-bisfosfato aldolasas de estructura cristalina conocida (Zannetti *et al.*, 1999). La fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de músculo de

conejo, RAMA, con la que tiene una homología del 45%, presenta el centro catalítico próximo al extremo C-terminal. En consecuencia, creímos que la fusión podía dañar menos la actividad enzimática si se realizaba por el extremo N-terminal.

En consecuencia, a la hora de fijar el orden de la fusión, se decidió clonar los genes de manera que la proteína quimera tuviera la función quinasa en el extremo N-terminal y la aldolasa en el extremo C-terminal, quedando una construcción quinasa-L-aldolasa como se muestra en la figura 33.

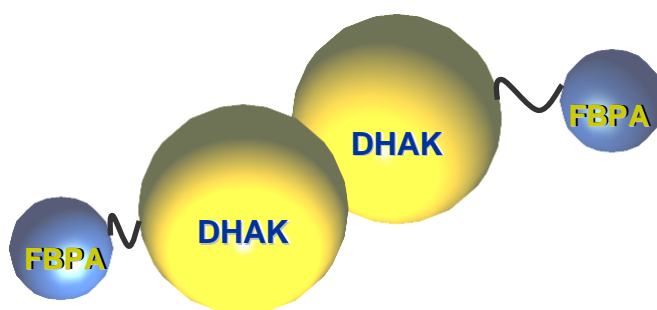


Figura 33. Representación esquemática de la proteína de fusión quinasa-aldolasa.

Clonaje y sobreexpresión de la FBPA de S. carnosus.

Con el fin de hacer estudios comparativos de la proteína bifuncional DLF con las proteínas silvestres fue necesario clonar la FBPA. Disponiendo de los enzimas silvestres, pudimos abordar el estudio del efecto de la fusión protéica sobre la estructura y actividad de la nueva enzima quimera.

El gen *fda* de *S. carnosus* (891 pb), codificante de la proteína FBPA, se amplificó de manera específica mediante PCR y se clonó en el vector de expresión pET-28b(+) utilizando como hospedador la cepa BL21(DE3) de *E. coli* (Fig. 34A).

La expresión de proteínas inducida por IPTG nos permitió, una sobreexpresión de la FBPA en la fracción de proteína soluble del 70% de proteína total con una productividad de 1130 U FBPA por litro de cultivo (Fig. 34B). Inicialmente, la FBPA se purificó en un único paso por IMAC con elución por imidazol. Así, se pudo alcanzar un nivel de pureza del 95%. Como veremos más adelante, para

utilizar la FBPA en síntesis, fue necesario introducir un segundo paso de purificación mediante exclusión molecular.

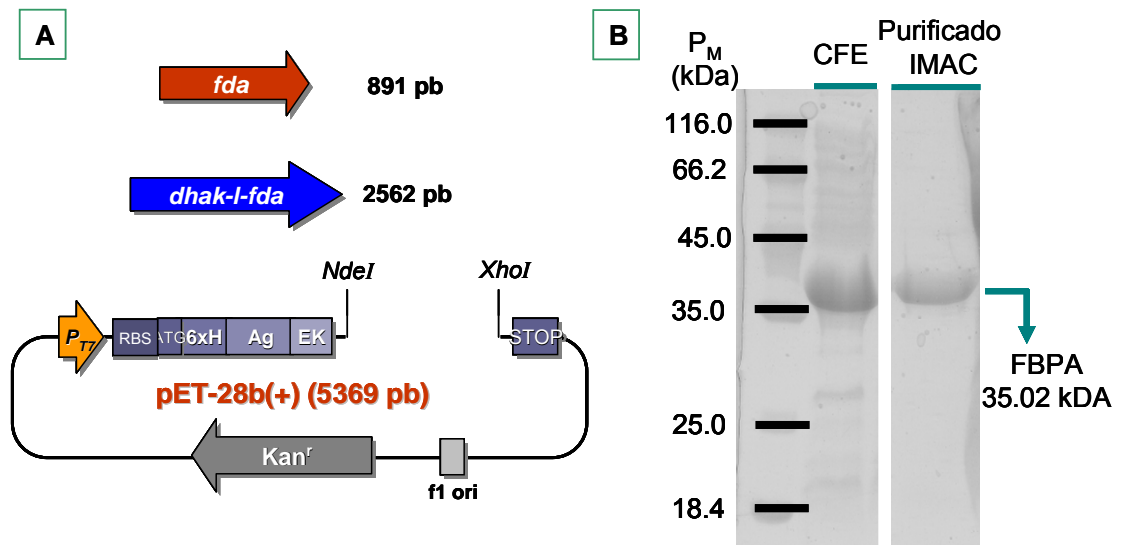


Figura 34. (A) Esquema de las construcciones pET-fda y pET-dhak-l-fda; (B) SDS-PAGE de la sobreexpresión y purificación del enzima FBPA.

Clonaje y sobreexpresión de la proteína de fusión.

Para la construcción del enzima de fusión DLF se utilizó el método de los 4 primers (Horton *et al.*, 1989), que nos permite la construcción de un gen de fusión mediante dos etapas de PCR (Fig. 35).

En un primer paso de PCR se amplificaron por separado los genes *dhak* de *C. freundii* y *fda* de *S. carnosus* incorporando dianas de corte para las enzimas de restricción *NdeI* (en el extremo 5' de *dhak*) y *XhoI* (en el extremo 3' de *fda*). En los extremos 3' de *dhak* y 5' de *fda* se introdujeron las secuencias correspondientes al linker.

Para la segunda etapa de PCR se utilizaron como molde de DNA los fragmentos *dhak-l* (1671 pb) y *l-fda* (906 pb) amplificados en el primer paso. En esta etapa se consigue fusionar ambos fragmentos gracias a la complementariedad del conector.

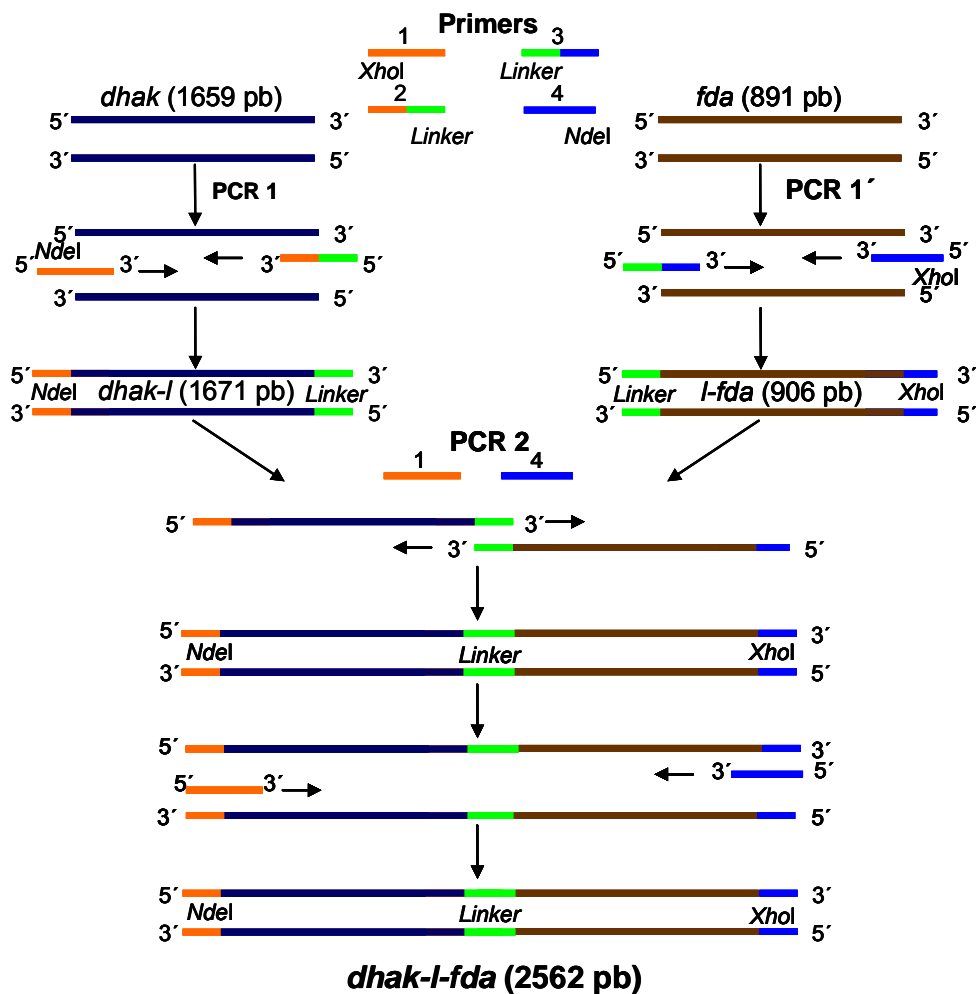


Figura 35. Esquema de amplificación del gen de fusión *dhak-l-fda* en dos pasos de PCR mediante el método de los 4 primers.

En la figura 36 se muestran los 3 fragmentos de DNA amplificados en las dos etapas de PCR, además se puede observar la especificidad lograda con las condiciones de PCR ensayadas, que permite amplificar exclusivamente el fragmento de interés. La construcción de fusión *dhak-l-fda* (2565 pb) se clonó en el plásmido de expresión pET-28b(+) entre las dianas de los enzimas de corte *XhoI* y *NdeI* utilizando como hospedador *E. coli* BL21(DE3) (Fig. 34A). El gen de fusión *dhak-l-fda* se secuenció íntegramente, para ello fue necesario diseñar tres oligos de secuenciación, uno específico de secuenciación de pET-28b(+) y dos más de la zona intermedia del gen de fusión. Así, pudimos comprobar que la secuencia se correspondía con la esperada para los genes *dhak* y *fda* y que contiene la secuencia del brazo espaciador y la secuencia

correspondiente a la cola de 6 histidinas introducida por el vector de expresión en el extremo N-terminal.

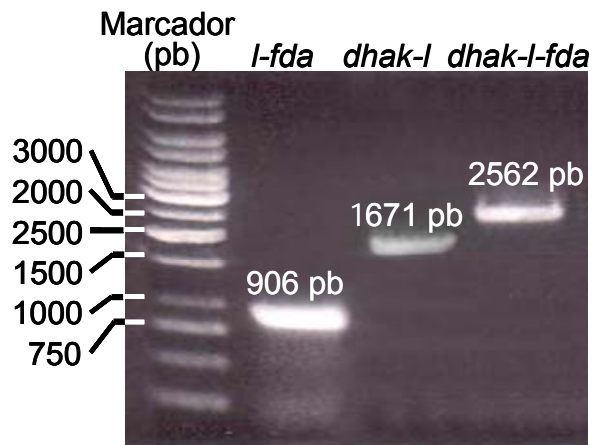


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de las dos etapas del método de los 4 primers.

La expresión de proteínas inducida por IPTG nos permitió, una sobreexpresión de la DLF en la fracción de proteína soluble del 75% de proteína total con una productividad de 135 U quinasa y 425 U aldolasa por litro de cultivo (relación 1:3) (Fig. 37). Como en el caso de la FBPA, la DLF se purificó inicialmente en un único paso por IMAC con elución por imidazol. Así, se pudo alcanzar un nivel de pureza del 95%. Como veremos más adelante, para utilizar la DLF en síntesis, fue necesario introducir un segundo paso de purificación de FPLC con exclusión molecular.

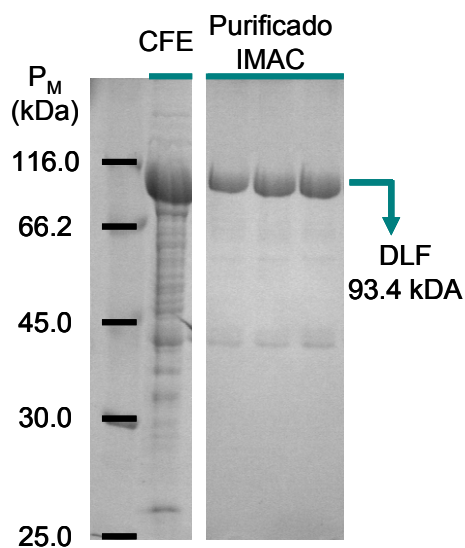


Figura 37. SDS-PAGE de la sobreexpresión y purificación del enzima de fusión DLF.

Caracterización estructural del enzima de fusión.

Estructura primaria.

Primeramente se procedió a la realización del análisis de aminoácidos de las tres proteínas (DHAK, FBPA y DLF) para, por un lado, determinar el coeficiente de extinción molar experimental y, por otro lado, aplicarlo como primera herramienta de identificación de estas proteínas.

Las muestras de proteína pura se prepararon conteniendo entre 5-10 μg de proteína calculados utilizando los coeficientes de extinción molar teóricos ($\epsilon^{280} = 40330, 10430$ y $37610 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para DHAK, FBPA y DLF respectivamente). Estas muestras fueron analizadas por triplicado por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), donde hidrolizaron las proteínas y la separación de los distintos aminoácidos se realizó mediante cromatografía de intercambio catiónico y con derivatización postcolumna con ninhidrina.

En la tabla 10 se muestra el número de aminoácidos teóricos en función de la secuencia esperada y el número de aminoácidos determinados

experimentalmente. En las tres proteínas analizadas se observa una buena correlación entre los datos experimentales y los teóricos, lo que confirma la identidad de las proteínas. Para el cálculo del coeficiente de extinción molar, sólo se consideraron aquellos aminoácidos cuyo número determinado experimentalmente se desviaba menos de 3 unidades respecto al valor teórico.

Tabla 10. Análisis de aminoácidos de las proteínas DHAK, FBPA y DLF.

Aminoácido	DHAK		FBPA		DLF	
	Nº aa teóricos	Nº aa experimentales	Nº aa teóricos	Nº aa experimentales	Nº aa teóricos	Nº aa experimentales
Asp	56	56.7 ± 0.6	41	41.7 ± 1.5	91	88.3 ± 0.6
Thr	32	33.7 ± 0.6	9	9.3 ± 0.6	40	43.0 ± 0.0
Ser	47	45.3 ± 0.6	19	21.3 ± 2.1	62	66.0 ± 0.0
Glu	54	60.3 ± 1.2	43	45.7 ± 2.3	96	95.7 ± 0.6
Gly	56	55.7 ± 0.6	21	22.7 ± 2.1	72	78.0 ± 1.0
Ala	74	80.7 ± 0.6	29	28.0 ± 1.0	102	105.3 ± 0.6
Cys	6	4.0 ± 1.0	-	-	5	3.5 ± 0.7
Val	41	40.0 ± 1.0	19	20.7 ± 1.2	60	56.0 ± 1.7
Met	20	17.0 ± 0.0	8	7.3 ± 0.6	23	23.3 ± 0.6
Ile	31	25.7 ± 0.6	25	20.0 ± 1.0	54	43.0 ± 0.0
Leu	64	68.3 ± 0.6	27	27.7 ± 1.2	89	91.7 ± 0.6
Tyr	9	9.0 ± 0.0	7	7.7 ± 0.6	14	15.0 ± 0.0
Phe	17	18.0 ± 0.0	11	11.7 ± 1.2	28	26.0 ± 0.0
His	21	13.0 ± 0.0	9	8.3 ± 0.6	23	27.3 ± 1.2
Lys	15	18.0 ± 0.0	28	27.7 ± 2.1	42	35.3 ± 0.6
Arg	28	27.0 ± 0.0	10	9.7 ± 1.2	34	38.0 ± 0.0
Pro	24	27.3 ± 0.6	10	8.0 ± 1.0	34	38.7 ± 0.6

Con las mismas muestras que se utilizaron para el análisis de aminoácidos se realizaron rectas de calibrado para absorbancias comprendidas entre 0.05 y 0.5 unidades de absorbancia a 280 nm. De este modo, con las concentraciones corregidas de acuerdo a los resultados del análisis de aminoácidos, pudimos determinar los coeficientes de extinción molar experimentales como las pendientes de dichas rectas de calibrado. Como se muestra en la figura 38, los

valores obtenidos de ϵ^{280} fueron 35599, 46292 y 77928 $M^{-1} cm^{-1}$ para DHAK, FBPA y DLF respectivamente. A la vista de estos resultados se puede comprobar que la tendencia habitual de utilizar los coeficientes de extinción molar teóricos para los cálculos de concentración de proteína lleva a un resultado erróneo que, en nuestro caso, supondría una sobrestimación en la concentración del doble para la DLF y de 4.4 veces para la FBPA.

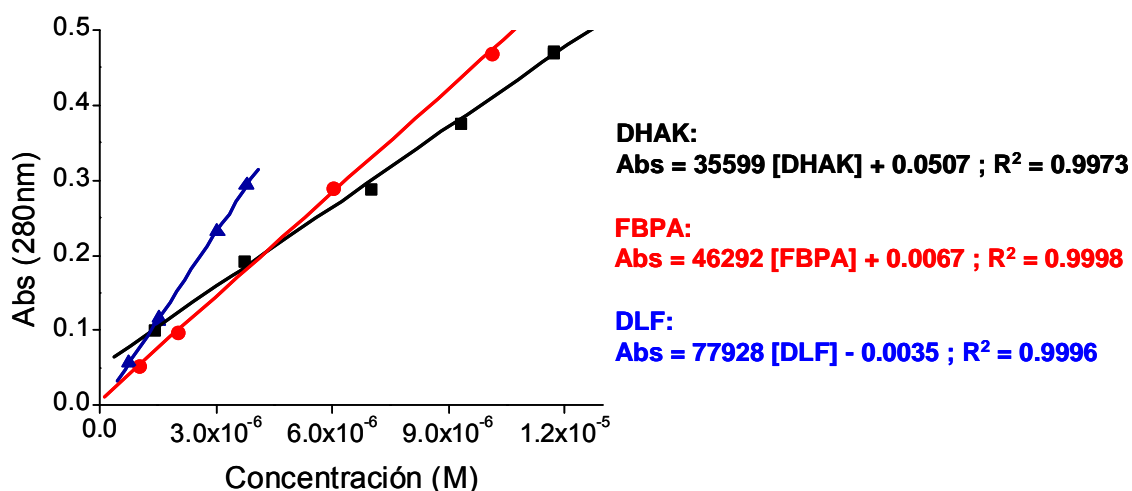


Figura 38. Rectas de calibrado que permiten calcular el coeficiente de extinción molar experimental de las proteínas DHAK, FBPA y DLF.

Como segunda herramienta de identificación de las tres proteínas, se realizó un análisis de sus huellas peptídicas a partir de las correspondientes bandas de los geles de SDS-PAGE en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). Las distintas muestras se digirieron con tripsina a 37°C durante una noche. La huella peptídica se genera por análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF en el rango $m/z = 800-3600$ de los péptidos generados tras la digestión del enzima. La comparación de la secuencia de estos péptidos con las bases de datos fue realizada con el programa MASCOT (Perkins *et al.*, 1999).

La huella peptídica correspondiente a la muestra de DHAK permitió la identificación de 29 péptidos que cubren la mayor parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína DHAK de *C. freundii* que figura en las bases de

datos (Fig. 39B). En el caso de la FBPA, la huella peptídica permitió la identificación de 20 péptidos que también cubren la mayor parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína que figura en las bases de datos (Fig. 40B).

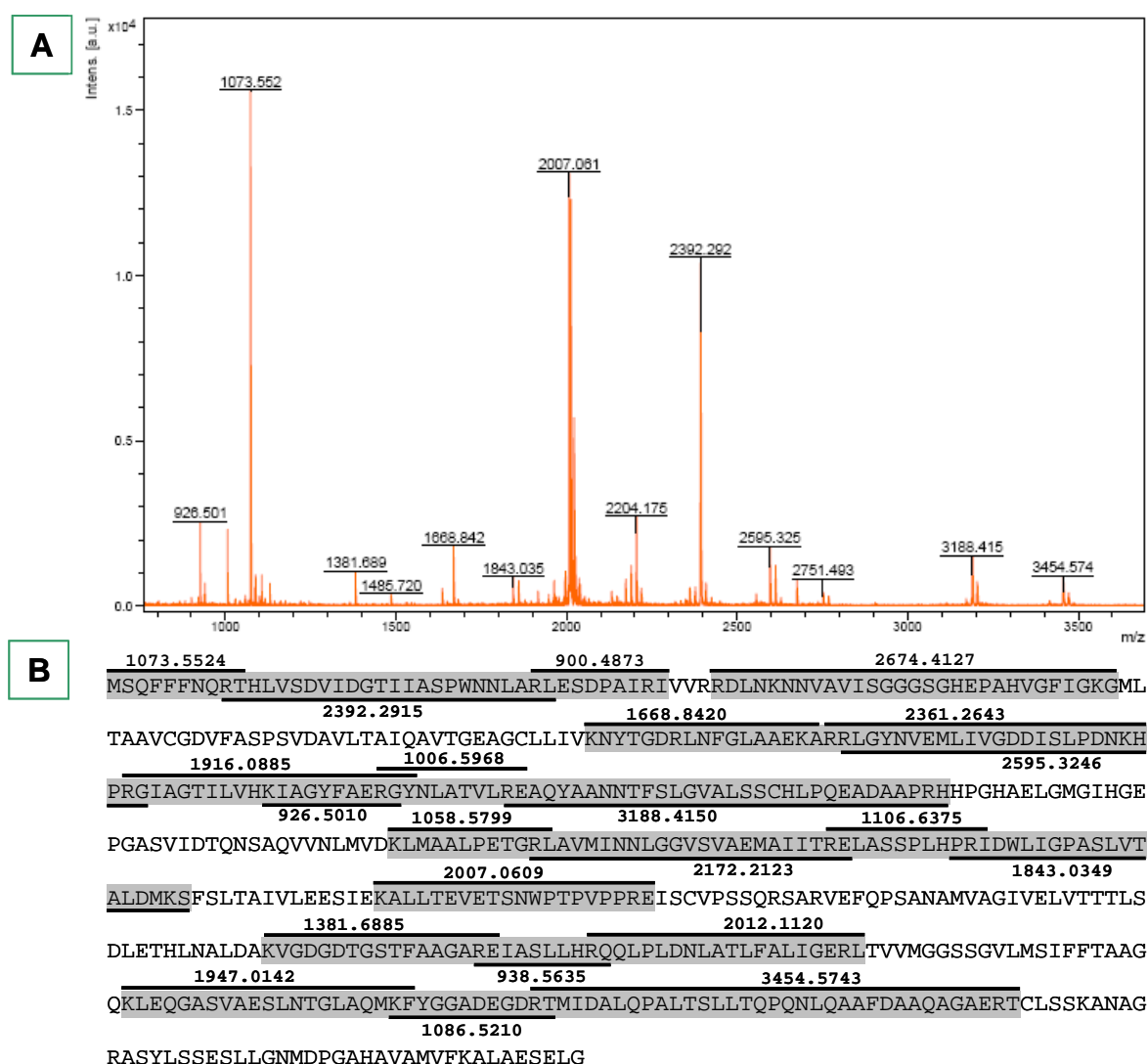


Figura 39. Huella peptídica de la DHAK; **(A)** cromatograma de la huella peptídica; **(B)** secuencia de la DHAK. Los péptidos identificados están sombreados.

La huella peptídica de la muestra correspondiente a la DLF permitió la identificación de 20 péptidos que cubren únicamente la parte de la secuencia correspondiente a la función quinasa que figura en las bases de datos. Sin embargo, quedaban un número significativo de péptidos sin asignar en la

búsqueda. Éstos fueron enfrentados con la secuencia de la FBPA con la herramienta FindMod de ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/findmod/>). Esta herramienta permite comparar las masas de péptidos obtenidas experimentalmente con las masas de los péptidos calculados por el programa para una secuencia teórica introducida.

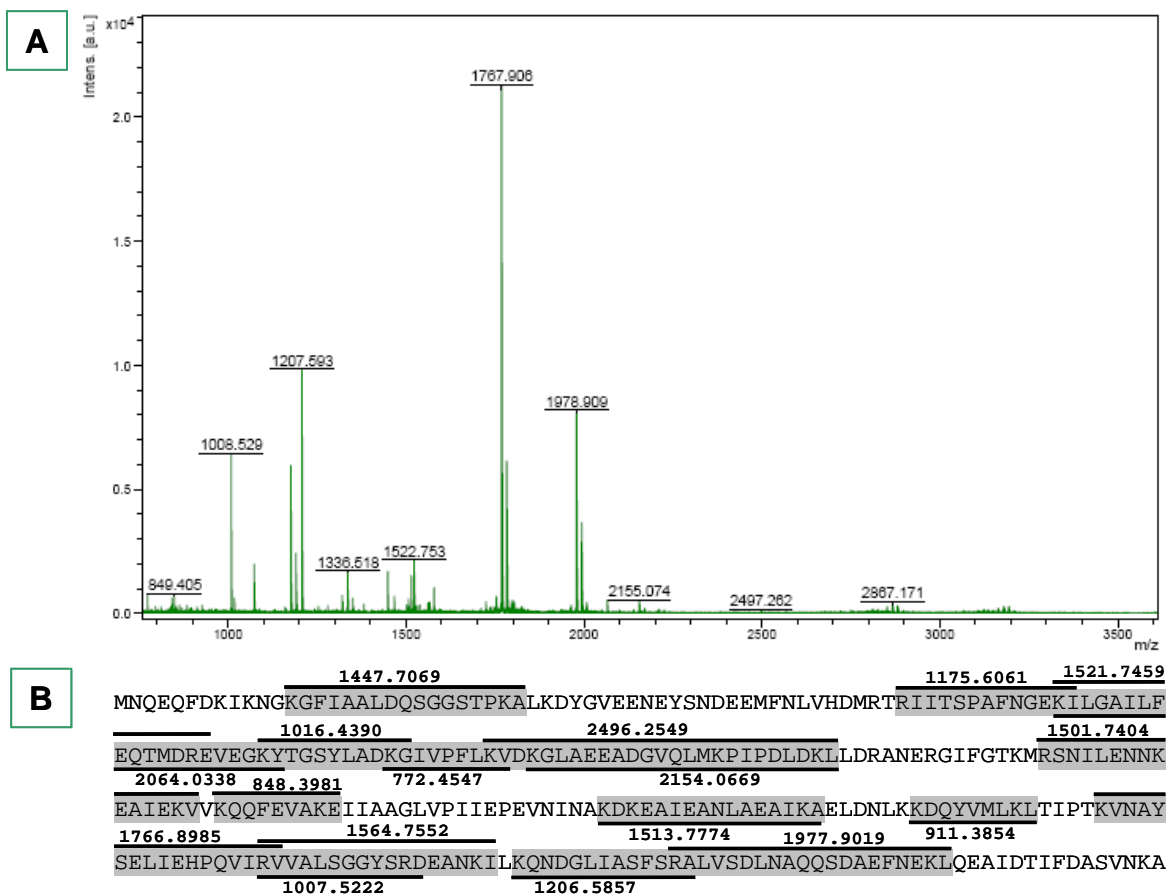


Figura 40. Huella peptídica de la FBPA; **(A)** cromatograma de la huella peptídica; **(B)** secuencia de la FBPA. Los péptidos identificados están sombreados.

Así, se pudo comprobar que 13 de los péptidos que no habían sido identificados se correspondían con péptidos esperados para la FBPA de *S. carnosus* (Fig. 41B). En este caso, la huella peptídica no reconoce la secuencia inicial de nuestra proteína de fusión, pero sí hemos podido comprobarla en la secuencia de DNA, ya que el gen de fusión está secuenciado en su construcción en pET-28b(+). En la secuencia de DNA sí están correctamente

Estructura secundaria.

La estructura secundaria de una proteína se puede estudiar mediante espectroscopía de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (190-250 nm), donde el cromóforo objeto de estudio es el enlace peptídico y la señal es dependiente del plegamiento. Como se puede observar en la figura 42, las estructuras de α -hélice, β -lámina y random coil presentan espectros de DC característicos en forma e intensidad. Así, los espectros de DC de una estructura predominantemente α -hélice se caracterizan por tener dos mínimos de intensidad a 222 y 208 nm y un máximo a 192 nm. Cuando la estructura es predominantemente β -lámina presenta un mínimo a 215 nm y un máximo a 198 nm. Cuando la proteína se muestra mayoritariamente como random coil el espectro de DC presenta un máximo a 212 nm y un mínimo a 195 nm.

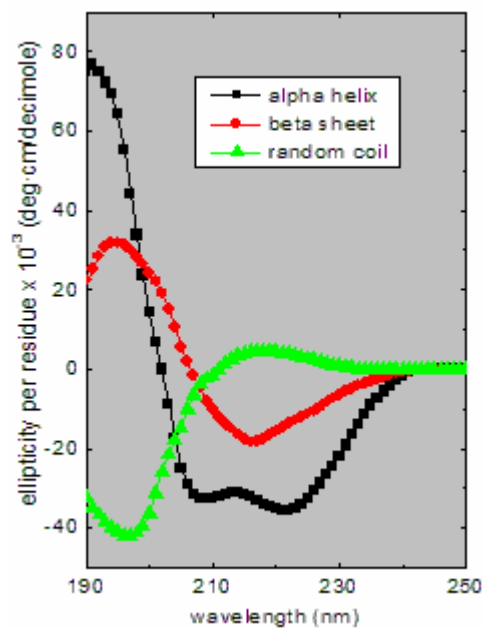


Figura 42. Espectros de DC en la región del UV-lejano para una cadena de polilisinas, $(Lys)_n$, en tres conformaciones distintas: α -hélice (a pH 10.8), β -lámina (a pH 11.1 después de calentar a 52°C y volver a enfriar) y random coil (a pH 7.0).

Para el estudio de la estructura secundaria de las tres proteínas (DHAK, FBPA y DLF), los espectros de DC se llevaron a cabo en la región del ultravioleta lejano (195-240 nm) a temperatura constante de 20°C. Cada espectro es una

media de cuatro registros y a todos ellos se les restó el correspondiente blanco. Todos los espectros se trataron y suavizaron con el programa informático Jasco Spectra Analysis.

El análisis de los espectros de dicroísmo circular se realizó con el paquete informático CDPro, compuesto por tres programas de cálculo: CONTIN, SELCON3 y CDSSTR (Sreerama y Woody, 2000). Para ello se utilizó el conjunto de proteínas de referencia nº4 de dicho paquete informático, compuesto por 43 proteínas solubles cuyos espectros de dicroísmo circular y estructura secundaria están analizados entre 190-240 nm.

El análisis de los resultados de estructura secundaria obtenidos para las proteínas DHAK, FBPA y DLF permite comprobar la buena correlación entre los datos experimentales y el ajuste teórico para las tres proteínas (Fig. 43). Además, el resultado de los tres programas es similar, de modo que se puede considerar como resultado general la media con su correspondiente desviación estándar.

Los espectros de la DHAK (Fig. 43A, 1-3) presentaron dos mínimos en la señal a ~208 y ~222 nm, indicativos de una estructura secundaria mayoritaria de α -hélice. El cálculo con CDPro de la contribución a la estructura secundaria determina un 41.4 ± 0.95 % de α -hélice, resultado concordante con la estructura cristalográfica conocida para la isoforma DHAK DSM 30040 (Siebold *et al.*, 2003).

Los espectros de la FBPA (Fig. 43B, 1-3) presentaron también un comportamiento característico de α -hélice, con dos mínimos en la señal a ~208 y ~222 nm. En este caso, la señal de dicroísmo es más intensa y los mínimos están más marcados, por lo que la contribución de la estructura en α -hélice es mayor que para la DHAK. Así, el cálculo de la contribución de los distintos elementos de estructura secundaria da un 67.2 ± 3.16 % de α -hélice.

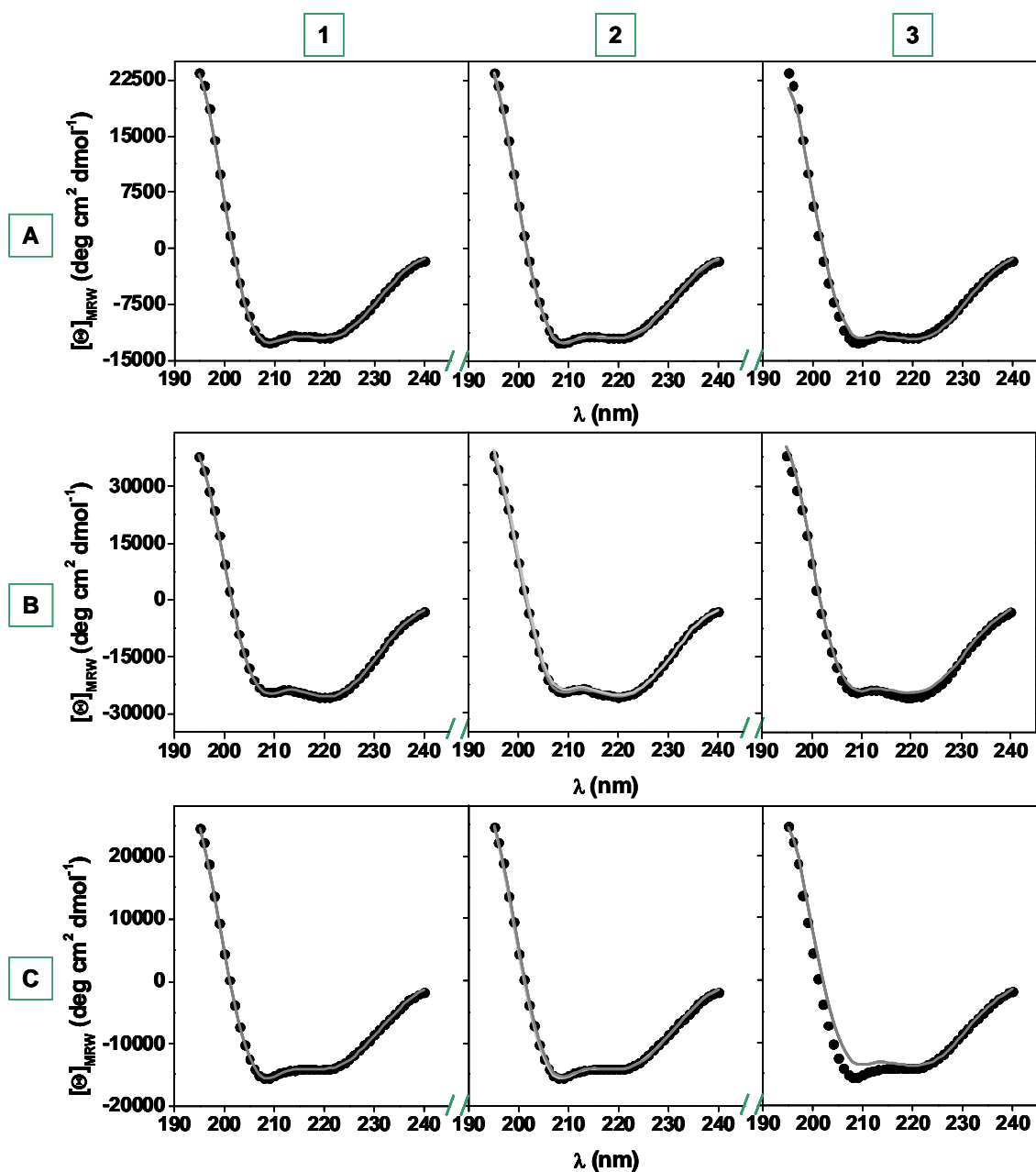


Figura 43. Espectros de DC a 20°C de **(A)** DHAK; **(B)** FBPA; **(C)** DLF. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas muestran los ajustes de los espectros teóricos calculados con **(1)** CONTIN, **(2)** SELCON3 **(3)** CDSSTR

A partir de los resultados obtenidos para las proteínas independientes, se puede calcular la composición estructural de una mezcla 1:1 (mol:mol) de DHAK y FBPA, que debería coincidir con la composición de la proteína DLF si la fusión no ejerciera ningún efecto en el plegamiento de cada uno de las proteínas (ec 1).

$$\psi_{DLF} = \frac{\psi_{DHAK} * PM_{DHAK} + \psi_{FBPA} * PM_{FBPA}}{PM_{DLF}} \quad \text{ec.1}$$

donde:

ψ es un elemento estructural (α -hélice, β -lámina, random coil o unrd).

PM es el peso molecular de la proteína correspondiente.

En este caso ideal, la composición en α -hélice de la mezcla 1:1 teórica sería de un 53.39%

Los espectros de la DLF (Fig. 43C, 1-3) presentaron un comportamiento típico de α -hélice, con dos mínimos en la señal a ~ 208 y ~ 222 nm. En este caso, la intensidad de la señal fue, como esperábamos, intermedia a la obtenida para las dos enzimas analizadas independientemente. Sin embargo, la proteína de fusión DLF presenta un 46.2 ± 1.81 % de α -hélice, un valor ligeramente menor que el calculado anteriormente para una mezcla 1:1 de las proteínas silvestres.

Para poder determinar si esta diferencia se debe al efecto de la fusión o a una interacción debida a la presencia de ambas proteínas en la misma muestra, se procedió a analizar la estructura secundaria de una mezcla 1:1 DHAK/FBPA (mol:mol). Nuevamente, como se puede observar en la figura 44, los espectros de esta muestra también presentan el comportamiento típico de α -hélice, con los dos mínimos de elipticidad a ~ 208 y ~ 222 nm. El resultado experimental obtenido para esta mezcla fue de un 52.7 ± 2.50 % de α -hélice, valor que se ajusta mucho mejor al dato calculado a partir de las estructuras de las proteínas aisladas (Ec. 1). Esta correlación se mantiene para el resto de elementos estructurales calculados según la ecuación 1, obteniéndose unos valores para los diferentes elementos de estructura secundaria de: 10.86% β -lámina, 15.72% giro, 25.75% unrd.

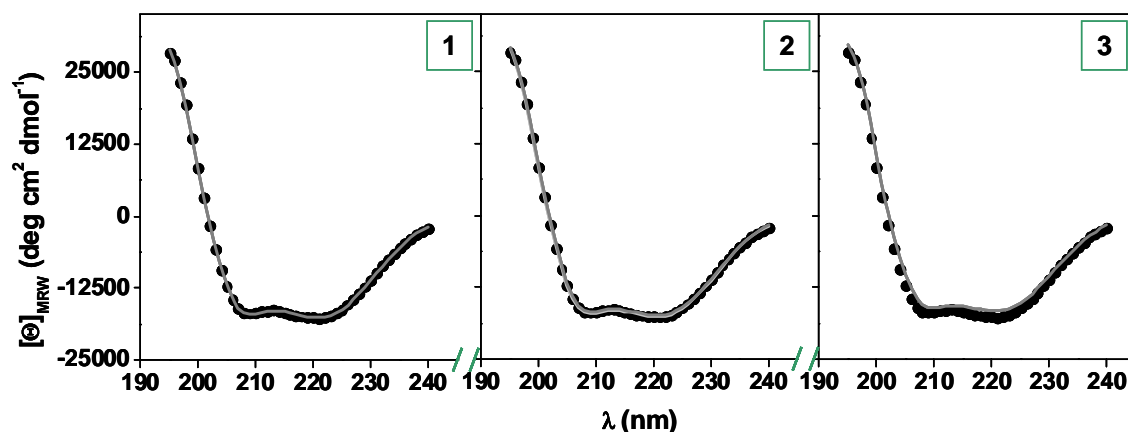


Figura 44. Espectros de DC a 20°C de una mezcla 1:1 DHAK:FBPA. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas muestran los ajustes de los espectros teóricos calculados con **(1)** CONTIN, **(2)** SELCON3 **(3)** CDSSTR.

A la vista de la buena correlación existente entre los datos teóricos y experimentales de la mezcla 1:1 DHAK:FBPA podemos determinar que la diferencia entre la proteína de fusión y la mezcla DHAK:FBPA es debida a la fusión y no a interacciones generadas por la presencia de las dos proteínas en la misma muestra.

Por lo tanto, podemos concluir que la unión covalente de las dos proteínas promueve cambios en la estructura secundaria de la proteína de fusión (Tabla 11). Esta fusión provoca una disminución de 6 puntos en el porcentaje de α -hélice con respecto a lo esperado en una mezcla 1:1. Esta disminución en el contenido de α -hélice está acompañada de un aumento significativo del porcentaje de β -lámina, que en lugar de ser el 8.3% obtenido para la mezcla 1:1, es de un 11.2% en el enzima de fusión. También aumentan en el enzima de fusión, con respecto a los valores esperados, el porcentaje de giro y de estructura sin orden, aunque en este caso los aumentos son más modestos (1 y 1.5%, respectivamente).

Tabla 11. Resumen de los resultados de los cuatro elementos estructurales analizados por el paquete CDPPro para las proteínas DHAK, FBPA y DLF y para una muestra que contiene una mezcla 1:1 DHAK:FBPA (mol:mol).

PROTEÍNA	% α -HÉLICE	% β -LÁMINA	% GIRO	% UNRD	PM (Da)
DHAK	41.4 \pm 0.95	13.2 \pm 0.93	16.8 \pm 0.46	28.2 \pm 1.95	63638.2
FBPA	67.2 \pm 3.16	5.0 \pm 2.80	11.4 \pm 3.05	17.4 \pm 4.20	35014.6
Mezcla 1:1	52.7 \pm 2.50	8.3 \pm 0.46	15.0 \pm 1.33	24.7 \pm 1.80	-
DLF	46.2 \pm 1.81	11.2 \pm 0.98	16.2 \pm 0.65	26.0 \pm 1.54	93385.0

Estructura cuaternaria.

El estudio de la estructura cuaternaria de las proteínas DHAK, FBPA y DLF se realizó mediante equilibrio de sedimentación.

Las muestras de proteína para la ultracentrifugación se prepararon en agua a pH 7.5 con una absorbancia final a 280 nm entre 0.1-1 uA. Las muestras fueron analizadas por triplicado en el departamento de Química-Física de Macromoléculas Biológicas del Instituto de Química-Física “Rocasolano” del CSIC, en una centrifuga analítica con detección UV-VIS.

El equilibrio de sedimentación de la DHAK nos dio una masa molecular aparente dependiente de la velocidad de centrifugación (Fig. 45). Este comportamiento tiene lugar cuando existen fenómenos de agregación. Además, este comportamiento no ideal también puede deberse a la estructura peculiar de la DHAK, que presenta un fosfolípido unido al dominio L de unión a ATP (Siebold *et al.*, 2003).

Para la FBPA, el comportamiento fue independiente de la velocidad de centrifugación y el peso molecular aparente se correspondía con el del monómero (Fig. 45). La estructura cristalográfica de la FBPA de *S. carnosus* no está descrita, pero mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes ya se había determinado su estructura monomérica (Brockamp y Kula, 1990a).

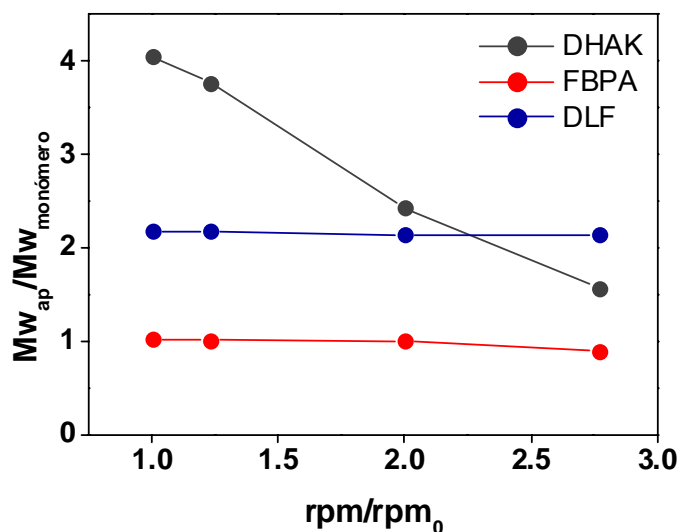


Figura 45. Equilibrio de sedimentación de las proteínas DHAK, FBPA, DLF.

Para la DLF, según la fusión que hemos realizado, esperábamos encontrar el comportamiento de un dímero. El equilibrio de sedimentación nos dio un comportamiento independiente de la velocidad de sedimentación, al igual que la FBPA, cuya masa molecular aparente fue la correspondiente al dímero esperado (Fig. 45). En este caso, con la fusión a la aldolasa, desaparecen los fenómenos de agregación que se habían detectado en la DHAK nativa.

Estudio de la estabilidad térmica del enzima de fusión.

El estudio de la estabilidad térmica del enzima bifuncional se ha realizado tanto desde un punto de vista estructural como funcional.

El estudio del efecto la temperatura sobre la estructura secundaria se realizó por dicroísmo circular mediante un barrido de temperatura entre 20 y 90 °C

registrando la señal de dicroísmo a 222 nm, con un incremento de temperatura de 40°C/h. Además, el barrido se detuvo a determinadas temperaturas para realizar espectros de estructura secundaria en la región del ultravioleta lejano (195-240 nm) a temperatura constante.

Las curvas de desnaturalización térmica se pueden analizar suponiendo un modelo de dos estados en el proceso de desnaturalización. Este modelo se ajusta a la ecuación 2 (Mayr *et al.*, 1993):

$$Y = (D_0 + m_D * X) - \frac{(D_0 - N_0) + (m_D - m_N) * X}{1 + \exp \frac{H_D (X - T_M)}{1.98 * (273.15 + X) * (273.15 + T_M)}} \quad \text{ec. 2}$$

donde:

D_0 es el valor de la señal de DC (en mdeg) del estado desnaturalizado a $T=0^\circ\text{C}$

m_D es la pendiente del estado desnaturalizado

N_0 es el valor de la señal de DC (en mdeg) del estado nativo a $T=0^\circ\text{C}$

m_N es la pendiente del estado nativo

T_M es la temperatura (en °C) del punto de inflexión de la transición

H_D es la entalpía van't Hoff asociada al proceso de desnaturalización a $T=T_M$.

La DHAK presentó un comportamiento que se ajusta a un modelo de transición en dos estados donde la T_M resultó ser de $49.91 \pm 0.09^\circ\text{C}$ (Fig. 46A).

Este comportamiento de transición en un paso en una proteína con dos dominios estructuralmente diferenciados (Siebold *et al.*, 2003) indica una cooperatividad en el plegamiento entre dichos dominios. Una vez que la muestra de DHAK desnaturalizada alcanzó los 90°C , se procedió a enfriar dicha muestra a 20°C para determinar la capacidad de recuperación de la estructura en dichas condiciones. Una vez alcanzada la temperatura se procedió a registrar el espectro de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano (195-240 nm) a temperatura constante de 20°C . Así, bajo estas condiciones ensayadas, la DHAK recupera solamente un 51.5% de la estructura secundaria original (Fig. 46B).

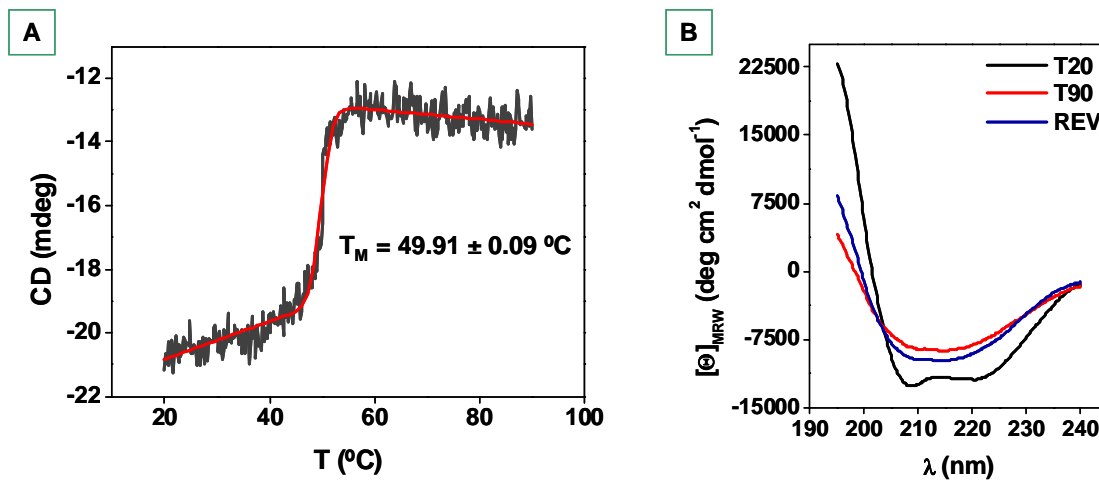


Figura 46. DHAK (A) Desnaturalización térmica. Los datos experimentales están representados en negro mientras que el ajuste a la ecuación 2 está representado en rojo; (B) Reversibilidad de la desnaturalización.

En el caso de la FBPA, cuya estructura cuaternaria ya hemos visto que es monomérica, los datos experimentales no se ajustan a una desnaturalización de dos estados con una única transición (Fig. 47A). Así, si intentamos ajustar los datos experimentales a la ecuación 2 nos da una T_M de $40.93 \pm 0.51^\circ\text{C}$.

Este dato no concuerda con el comportamiento termoestable de la FBPA previamente descrito en bibliografía (Brockamp y Kula, 1990a).

Sin embargo, si consideramos los datos experimentales divididos en dos tramos y ajustamos cada uno a una desnaturalización de una transición, obtenemos dos temperaturas de desnaturalización para la FBPA, $42.35 \pm 0.95^\circ\text{C}$ y $71.62 \pm 4.34^\circ\text{C}$ (Fig.47 B-C). Dado que la FBPA está descrita en bibliografía como termoestable, la primera transición debería tratarse de un cambio conformacional que no afecte al centro activo de la proteína.

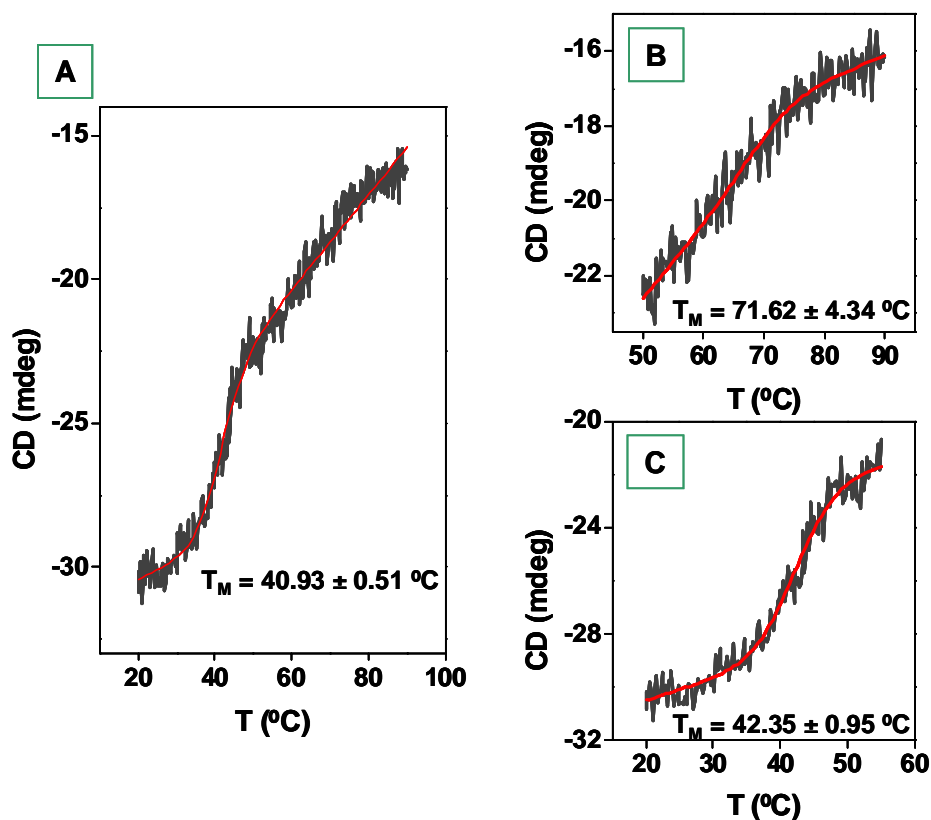


Figura 47. FBPA: Desnaturalización térmica. **(A)** Ajuste en una transición en un solo paso; **(B-C)** Ajuste dividido en dos tramos. En los tres casos los datos experimentales están representados en negro mientras que el ajuste a la Ec. 2 está representado en rojo.

Dado que los ajustes de la desnaturalización de la FBPA a la ecuación 2 no son demasiado buenos, ya que predicen una T_M demasiado baja para una proteína termoestable, decidimos estudiar la estabilidad de la FBPA mediante la representación de la fracción de proteína desplegada, f_U o “fraction of unfolding”, que nos permite determinar la temperatura a la cual se produce el 50% del desplegamiento (Wong y Tanford, 1973). Además, dado que este parámetro se puede emplear para la comparación de estabilidad de distintas proteínas (Kelly y Price, 1997) lo calculamos también para la DHAK. Como se ve en la figura 48, esta T_{05} es de 54.9 °C para la FBPA, significativamente mayor que la T_{05} de 48.7 °C calculada para la DHAK.

Además, también se puede observar cómo la desnaturalización de la FBPA se produce de una manera gradual, mientras que la DHAK presenta una transición mucho más brusca. En el caso de la DHAK podemos comprobar una buena correlación en las temperaturas calculadas por los dos métodos.

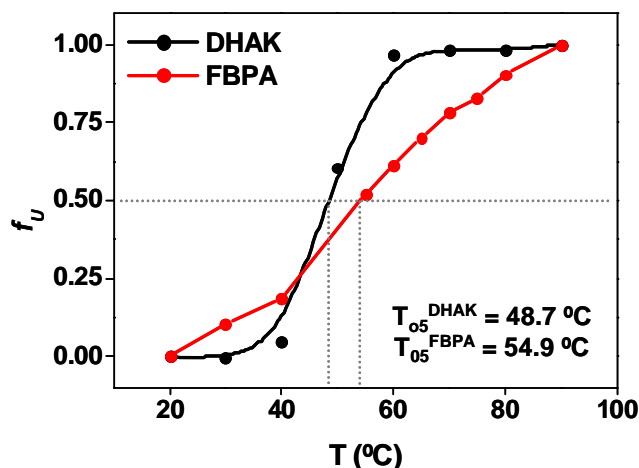


Figura 48. Representación de la fracción de proteína desnaturalizada, f_u , frente a la temperatura para las proteínas aisladas DHAK y FBPA.

Al ensayar la reversibilidad de la FBPA en las mismas condiciones que se utilizaron para la DHAK, pudimos comprobar que la FBPA recupera hasta un 92.1% de la estructura original al enfriar la muestra (Fig. 49). Este resultado explica a nivel estructural la termoestabilidad funcional anteriormente descrita para este enzima (Brockamp y Kula, 1990a).

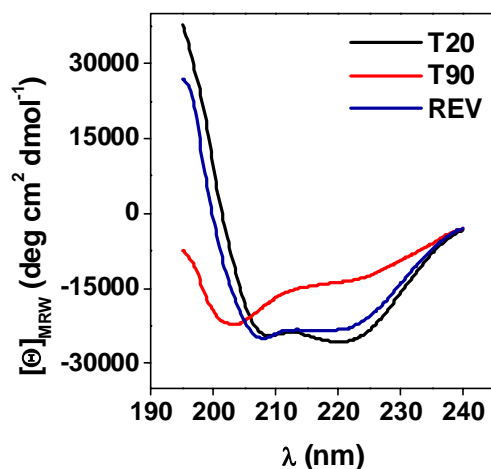


Figura 49. Reversibilidad de la desnaturalización térmica de la FBPA.

En el caso de la DLF, que es un dímero que, en principio, podría tener tres dominios de plegamiento estructuralmente independientes (dos de la quinasa y el otro de la aldolasa), los datos experimentales se ajustan a una desnaturalización de dos estados con una transición rápida y el resultado del ajuste da una T_M de 51.78 ± 0.25 °C (Fig. 50A). Su comportamiento rápido y en un paso durante la desnaturalización hace pensar en una cooperatividad en el plegamiento entre los distintos dominios. Además, se observa que la DLF presenta una temperatura de fusión intermedia a las correspondientes proteínas nativas, ligeramente superior a la T_M de la DHAK aunque menor que la T_M de la segunda transición de la FBPA.

Al ensayar la reversibilidad de la proteína de fusión como en los casos anteriores pudimos comprobar que la DLF recupera un 54.1% de la estructura (Fig. 50B). En este caso la DLF presenta un comportamiento muy similar a la DHAK, lejos de la recuperación casi completa de la estructura de la aldolasa.

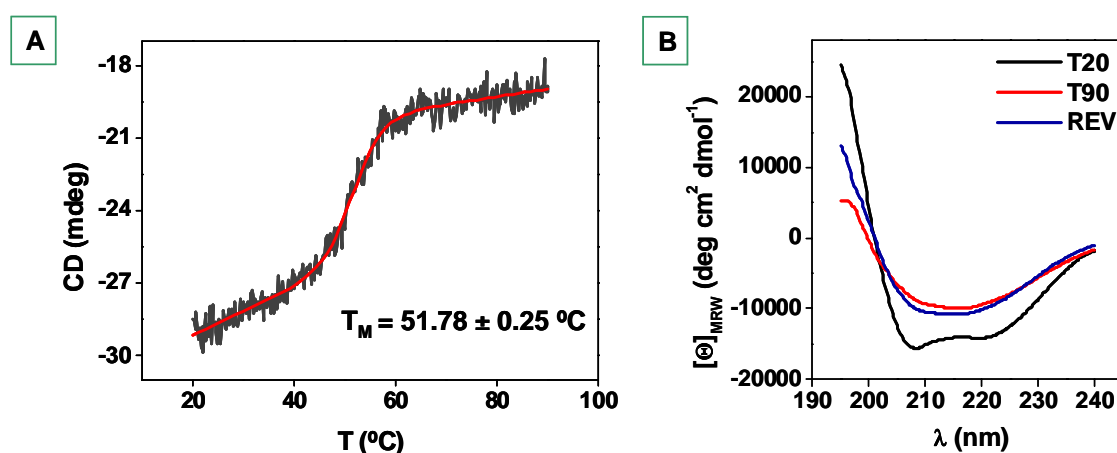


Figura 50. DLF (A) Desnaturalización térmica. Los datos experimentales están representados en negro mientras que el ajuste a la ec. 2 está representado en rojo; (B) Reversibilidad de la desnaturalización.

Con el fin de determinar si la unión covalente de las dos proteínas ejercía un efecto sobre la estabilidad térmica de modo similar a como habíamos comprobado que lo ejercía sobre la estructura secundaria, estudiamos el

comportamiento de la estructura frente a la temperatura para una mezcla 1:1 de DHAK y FBPA (Fig. 51).

En este caso obtuvimos una temperatura de fusión de 44.23 ± 0.51 °C. Además, en la figura 51 A podemos observar que la transición no se produce de forma rápida, como en el caso de la proteína de fusión, sino que es una transición lenta, suma de las transiciones de las dos proteínas que constituyen la mezcla.

En cuanto a la reversibilidad de la desnaturalización, como hemos descrito anteriormente, el comportamiento ideal de una mezcla 1:1 de DHAK y FBPA daría una recuperación del 69.6% de la estructura (ec.1).

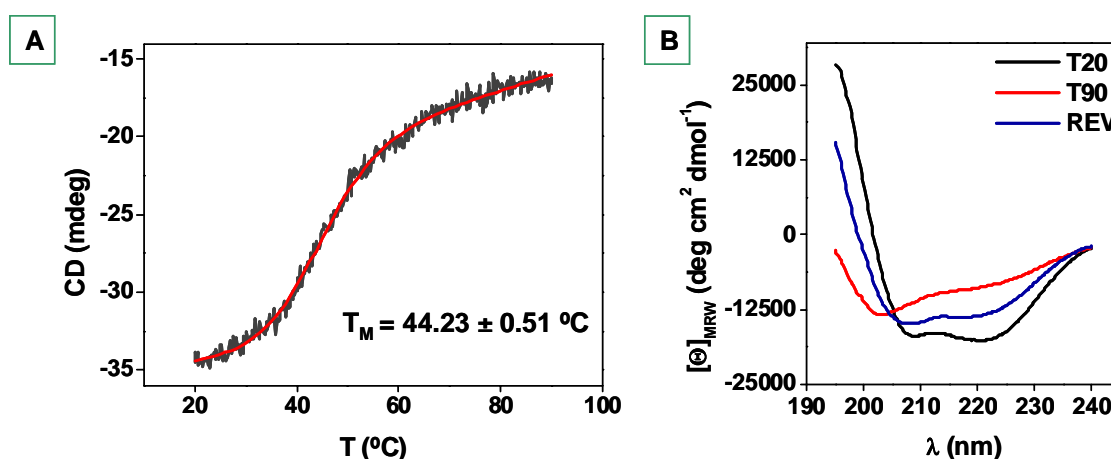


Figura 51. Mezcla 1:1 DHAK/FBPA. **(A)** Desnaturalización térmica. Los datos experimentales están representados en negro mientras que el ajuste a la ecuación 2 está representado en rojo; **(B)** Reversibilidad de la desnaturalización.

Para comprobar si la diferencia entre este valor teórico y el obtenido experimentalmente para la DLF está motivada por la fusión o por la presencia de los dos enzimas en la misma muestra, se analizó la recuperación de la estructura tras la desnaturalización de una muestra 1:1 DHAK:FBPA. Así, pudimos comprobar que la mezcla 1:1 recupera un 69.6% de la estructura (Fig. 51 B), que es el porcentaje que esperábamos a partir de los resultados obtenidos para las proteínas nativas. Esto indica que la recuperación de la

estructura de la proteína de fusión no es un sumatorio de la recuperación de las enzimas nativas.

Este efecto negativo que presenta la fusión en cuanto a la pérdida de capacidad de recuperación estructural se ve compensado con un aumento en la temperatura de fusión de la DLF frente a la mezcla 1:1 DHAK:FBPA. Si tenemos en cuenta la representación de la fracción de proteína desplegada f_U (Fig. 52), podemos comprobar cómo la fusión aumenta la T_{05} en 4.4 °C con respecto a la mezcla.

Este estudio estructural de la termoestabilidad del enzima de fusión se complementó con un estudio funcional de la estabilidad térmica a 45 °C. Para ello se incubaron dos muestras para cada una de las proteínas, DHAK, FBPA y DLF, una a temperatura ambiente y la otra a 45°C y se monitorizó su actividad a lo largo del tiempo. Dado que la medida de actividad se realizó a temperatura ambiente, independientemente de la temperatura de incubación, lo que estamos midiendo en este ensayo es la pérdida de actividad debida a la desnaturalización irreversible de los enzimas a esta temperatura.

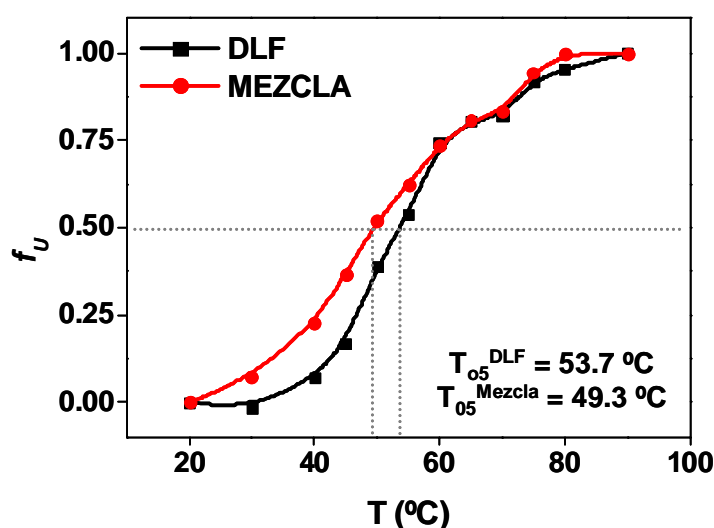


Figura 52. Representación de la fracción de proteína desnaturalizada, f_U , frente a la temperatura para la proteína de fusión y una mezcla 1:1 de las proteínas nativas DHAK:FBPA.

Durante el transcurso del ensayo no se apreció caída en la actividad de ninguno de los enzimas incubados a temperatura ambiente, sin embargo, el comportamiento a 45 °C fue diferente (Fig. 53).

La DHAK presenta una caída en la actividad que da una vida media del enzima a 45 °C de 68 minutos. Este resultado es compatible con la T_M de 49.91 °C calculada a partir de los datos de DC.

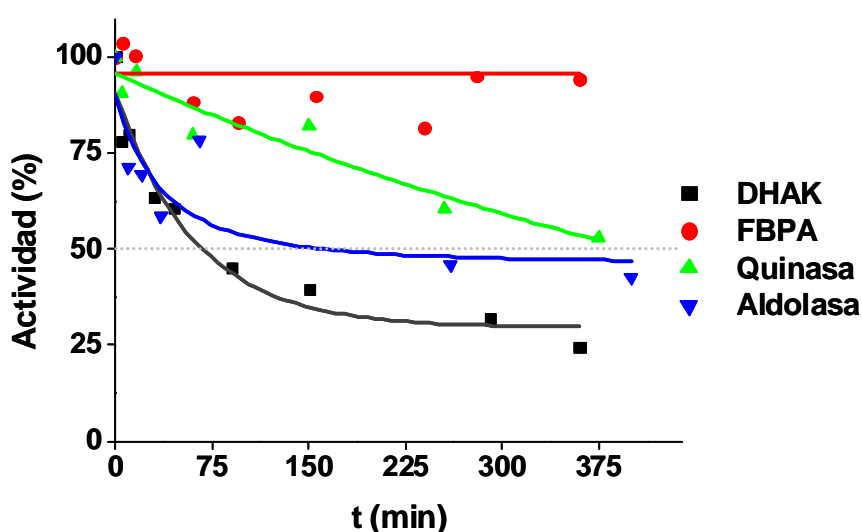


Figura 53. Estudio del efecto de la T sobre la actividad enzimática.

Por el contrario, la FBPA mantiene su actividad, no pudiendo determinarse su vida media en las condiciones del ensayo. Este resultado nos da una idea de la termoestabilidad operacional del enzima, pero además nos confirma que el ajuste de los datos de DC a la ecuación 2 teniendo en cuenta una única transición no es válido para esta proteína ($T_M=40.93^\circ\text{C}$). Además, confirma que la primera temperatura de fusión calculada mediante el ajuste en dos transiciones ($T_M=42.35^\circ\text{C}$) tiene que estar asociada a un cambio estructural que no afecte al centro activo.

La proteína de fusión por su parte, presenta una vida media de 6h 40 min para la función quinasa y de 2h 30min para la función aldolasa. Estos datos concuerdan con la T_{Ms} calculada a partir de los datos de DC y muestran un comportamiento intermedio entre la DHAK y la FBPA. Es decir, aunque la función aldolasa se desestabiliza significativamente respecto a la proteína

nativa, la función quinasa se estabiliza notablemente con la fusión. A pesar de la menor estabilidad térmica de la actividad aldolasa en el enzima de fusión, el efecto más notable es la estabilización de la función quinasa, ya que con la fusión hemos conseguido aumentar la estabilidad térmica de la proteína más inestable, consiguiendo por tanto un aumento de la estabilidad térmica del sistema multienzimático en su conjunto.

Caracterización funcional.

Determinación de parámetros cinéticos.

La caracterización cinética del enzima de fusión se realizó de forma independiente para cada una de las actividades. Así, los parámetros cinéticos de la proteína de fusión DLF se calcularon respecto a la fosforilación de DHA para la función quinasa y respecto a la reacción retroaldólica de la aldolasa utilizando como sustrato la fructosa-1,6-bisfosfato.

Nuevamente, para analizar el efecto de la fusión era necesario disponer de la caracterización cinética de los enzimas independientes. Por lo tanto, también se estudió el comportamiento cinético de la FBPA nativa respecto a la reacción retroaldólica con fructosa-1,6-bisfosfato. La caracterización de la DHAK ya se había llevado a cabo en nuestro laboratorio como parte de la Tesis Doctoral de Israel Sánchez-Moreno.

Como ya hemos mencionado anteriormente, los parámetros cinéticos de la DHAK respecto a la fosforilación de DHA muestran un comportamiento de Michaelis-Menten con una K_M de 1.22×10^{-3} mM y una k_{cat} de $1.45 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$. El valor de k_{cat}/K_M de $1.19 \times 10^6 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$, es el más alto descrito en la literatura para una DHAK confirmando la idoneidad de este biocatalizador para la obtención enzimática de DHAP.

La FBPA, respecto a la fructosa-1,6-bisfosfato, muestra un comportamiento michaeliano (Fig. 54 A), con una K_M de 1.46×10^{-2} mM y una k_{cat} de 4.84×10^7 min^{-1} . Además, presenta una constante de especificidad en el orden de 10^9 . El valor de K_M calculado para esta FBPA recombinante es muy similar al previamente descrito de 2.2×10^{-2} mM para el enzima nativo de *S. carnosus* (Brockamp y Kula, 1990a).

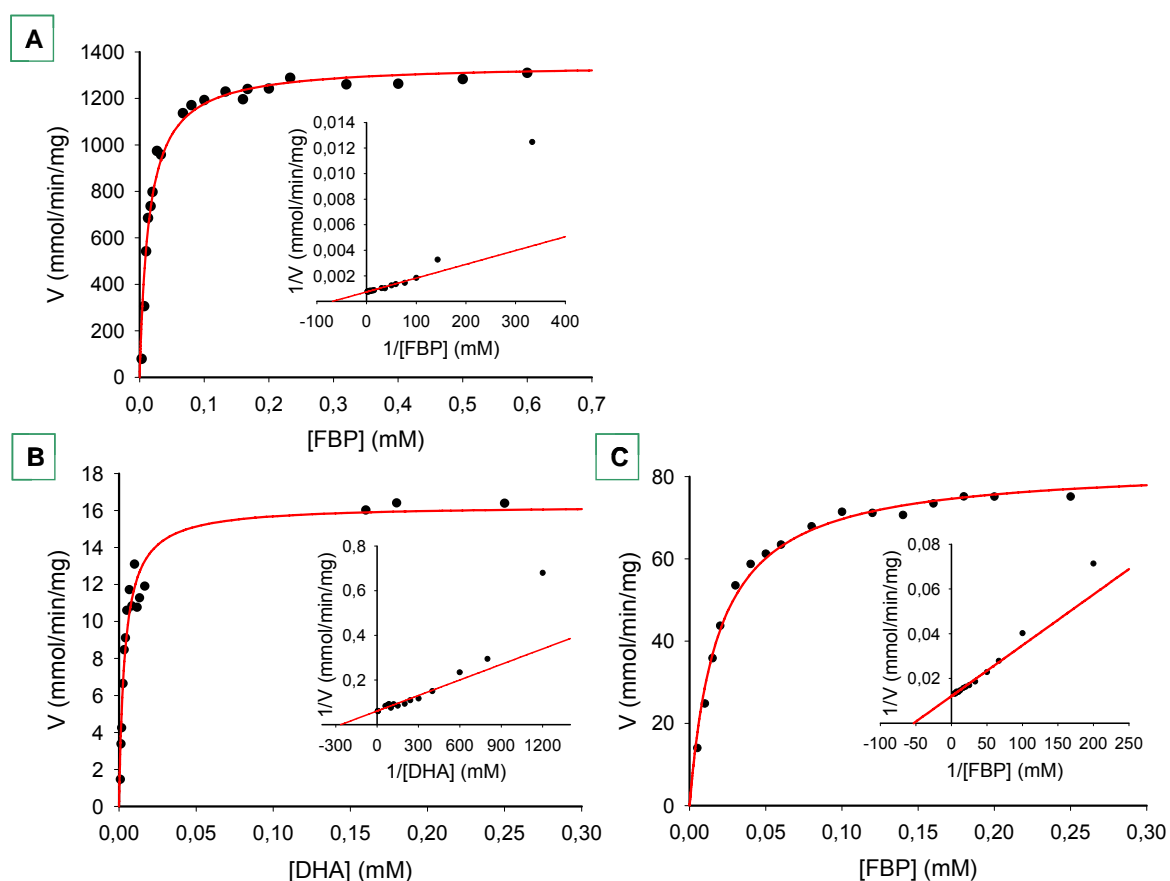


Figura 54. Cinéticas de los enzimas FBPA y DLF. **(A)** Actividad retroaldólica de la FBPA; **(B)** Actividad DHAK de la proteína DLF a concentraciones crecientes de DHA; **(C)** Actividad retroaldólica de la proteína DLF respecto a la FBP. Los insertos muestran la representación doble-recíproca.

La DLF presenta un comportamiento michaeliano respecto a la DHA (Fig. 54B), con una K_M de 3.78×10^{-3} mM y una k_{cat} de 3.53×10^2 min^{-1} . Su función aldolasa también presenta un comportamiento michaeliano respecto a la FBP (Fig. 54C), con una K_M de 1.82×10^{-2} mM y una k_{cat} de 1.70×10^3 min^{-1} .

Analizando los resultados obtenidos (Tabla 12), se comprueba que la fusión no afecta significativamente a los valores de K_M de las dos actividades, indicando

que la unión de los sustratos al centro activo no se ve dificultada o impedida en el caso de la enzima de fusión. Por el contrario, mientras el valor de k_{cat} disminuye sólo un orden de magnitud para la función quinasa, la disminución es de 4 órdenes de magnitud en la función aldolasa. Esta disminución en el número de recambio de las actividades en la proteína de fusión podría explicarse por un descenso en el número de centros catalíticos accesibles o bien por la existencia de interacciones no productivas entre los sustratos y sus respectivos centros activos (Bastida *et al.*, 2001).

Tabla 12. Resumen de los parámetros cinéticos de los enzimas DHAK, FBPA y DLF.

	DHAK	FBPA	DLF	
			Quinasa	Aldolasa
K_M (mM ⁻¹)	1.22×10^{-3}	1.46×10^{-2}	3.78×10^{-3}	1.82×10^{-2}
k_{cat} (min ⁻¹)	1.45×10^3	4.84×10^7	3.53×10^2	1.70×10^3
k_{cat} / K_M (min ⁻¹ mM ⁻¹)	1.19×10^6	3.33×10^9	9.34×10^4	9.34×10^4

A pesar de la disminución observada en el valor de k_{cat}/K_M del enzima de fusión, dada la alta eficiencia catalítica de los enzimas de partida, el resultado es que el valor de 10^4 encontrado para las dos actividades integrantes del enzima de fusión es suficientemente alto para su aplicación en síntesis.

Estudio del efecto de la fusión en la transferencia de sustrato.

Para estudiar el efecto de la proximidad de los centros activos del enzima de fusión en su eficiencia catalítica, se analizó la reacción utilizando el benciloxiacetaldehído (**8**) como sustrato. Se llevaron a cabo dos conjuntos de reacciones, unas con las proteínas independientes y otras con el enzima bifuncional. Para este estudio se evitó la utilización del sistema de regeneración de ATP.

La aplicación del enzima de fusión en la formación de enlaces C-C fija la relación de actividad quinasa:aldolasa en 1:3, con lo que fue necesario ensayar las reacciones con los enzimas nativos en esa misma relación. Además, para que en caso de observarse diferencias entre las dos series de reacciones, éstas se pudieran atribuir inequívocamente a la proximidad de los centros activos y no a una diferencia en la actividad específica de los enzimas, en ambas series se utilizó el mismo número de unidades de actividad quinasa y aldolasa.

En la figura 55 se observa que la velocidad de reacción es mucho mayor en el caso de la enzima fusionada que en las reacciones donde ambas enzimas se encuentran separadas. Considerando la pendiente de la zona lineal, la proteína de fusión tiene una velocidad de reacción de $0.41 \mu\text{mol}/\text{min}$ para la formación de aldol, mientras que el sistema multienzimático con las proteínas independientes tiene una velocidad de formación de aldol de $0.02 \mu\text{mol}/\text{min}$. Es decir, la fusión hace que, en las condiciones ensayadas, la reacción de formación de aldol tenga lugar 20 veces más rápido que el mismo ensayo con las enzimas libres. Este efecto se discutirá con mayor detalle más adelante.

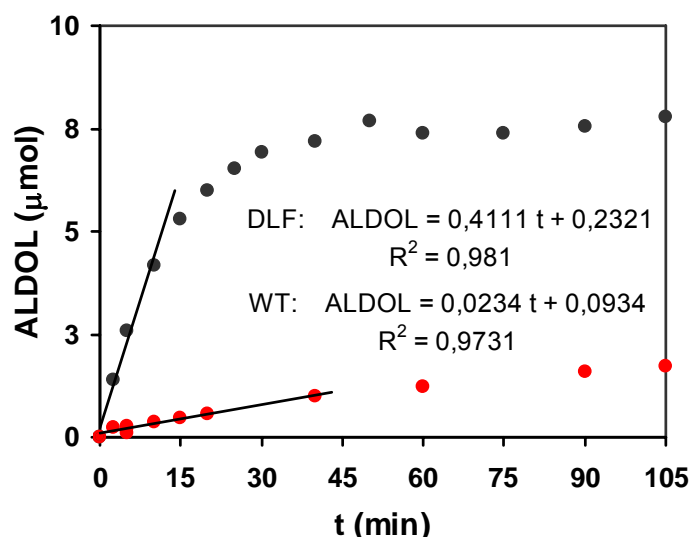


Figura 55. Estudio del “efecto de proximidad”. Evolución de la formación de aldol con el tiempo.

Aplicación sintética del enzima de fusión DLF.

Estudios preliminares.

Para el estudio de la aplicabilidad sintética del enzima de fusión se seleccionaron el acetaldehído (aldehído **2**) como representante de los aldehídos alifáticos de cadena corta, el benciloxiacetaldehído (**8**) como aldehído con un anillo aromático y el 3-(metiltio)propionaldehído (**9**) como aldehído con un heteroátomo (Fig. 56).

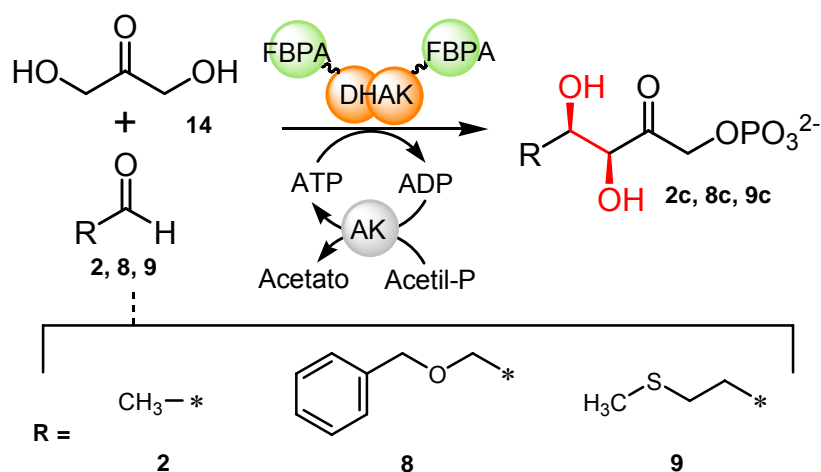


Figura 56. Esquema del sistema multienzimático utilizando la proteína de fusión DLF. Se muestra la estructura de los aldehídos ensayados

Como ya hemos descrito anteriormente, la utilización de aldolasas dependientes de DHAP para la síntesis de enlaces C-C es muy sensible a la presencia de TIM como contaminante en las preparaciones enzimáticas (Dinkelbach *et al.*, 2001) (Fig. 25). Como primer paso para la utilización del enzima de fusión en la síntesis de enlaces C-C, se realizaron controles de contaminación por TIM, tanto en la DLF como en la FBPA. Para ello se pusieron reacciones que contenían todos los componentes necesarios para la reacción aldólica excepto el aldehído. Cuando se utilizaron para estos controles proteínas purificadas por IMAC con elución por imidazol, estos controles dieron positivo, es decir, se observaba la formación de aldol de hasta el 40% para la FBPA y del 20% para la DLF en 3h. En principio, no esperábamos la

contaminación por TIM, ya que no se observaba ninguna banda de proteína a 27 kDa en los geles de SDS-PAGE, correspondiente al peso de la TIM de *E. coli* (Riley *et al.*, 2006) (ver Fig. 26, 34 y 37).

Así, se decidió someter las distintas proteínas a un segundo paso de purificación por exclusión molecular (Fig. 57).

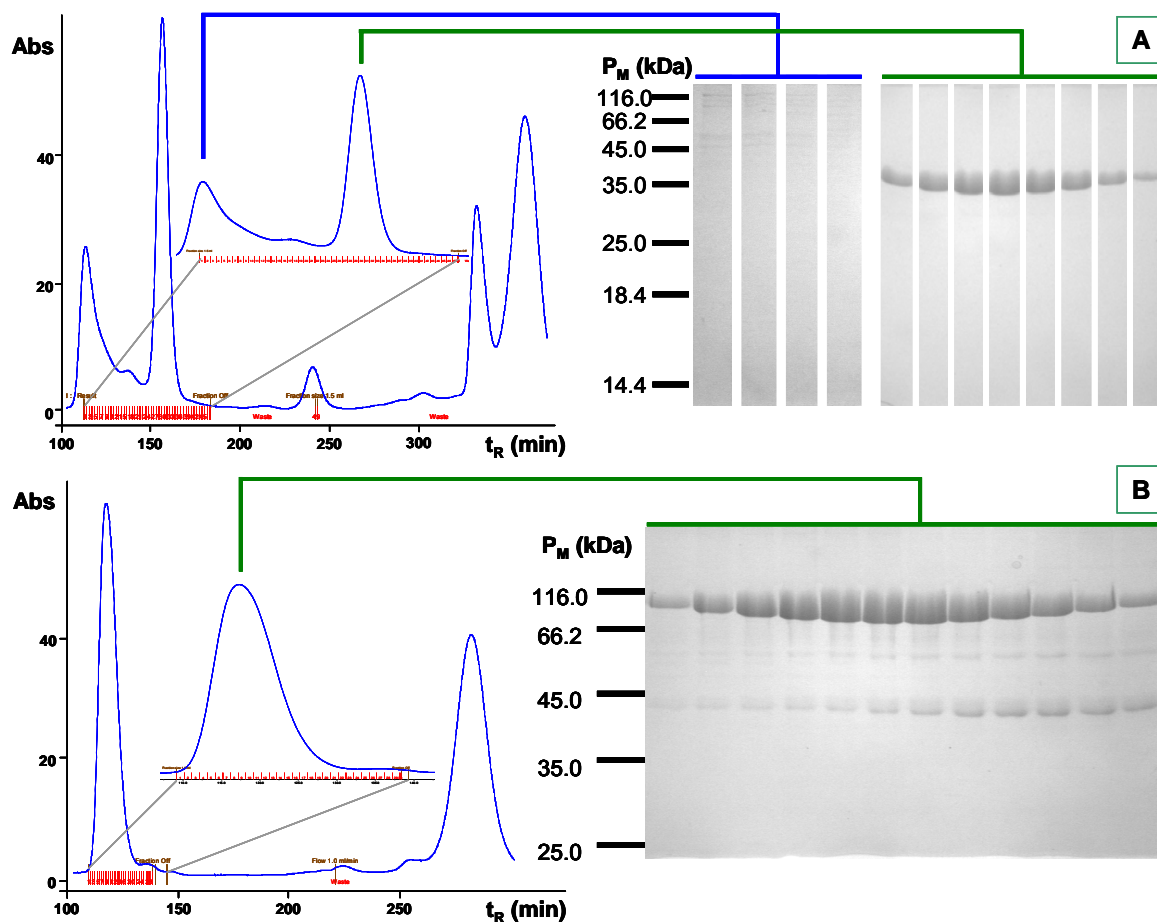


Figura 57. Purificación por exclusión molecular de las proteínas (A) FBPA; (B) DLF.

El purificado por IMAC de la FBPA, por exclusión molecular da lugar a dos picos de proteína. Un análisis por SDS-PAGE de estos picos permite comprobar que el primer pico se corresponde con impurezas de proteínas de elevado peso molecular, mientras que la FBPA eluye con tiempos de retención entre $t_R=152-164$ min. Sin embargo, los controles realizados a los distintos eluidos muestran formación de aldol en los 3 eluidos de $t_R=152-156.5$ min, que dan una formación de aldol a las 18h del 17, 14 y 3%, respectivamente. Los

eluídos a $t_R > 156.5$ min no dan formación de aldol a las 18h. Del mismo modo, la proteína de fusión DLF eluye en un único pico entre $t_R = 111-127$ min, pero en este caso conseguimos eliminar completamente la contaminación por TIM, ya que no se observa formación de aldol en 18h con ninguno de los eluídos.

Como ya habíamos visto anteriormente, la DHAK había necesitado también un segundo paso de purificación por exclusión molecular (Fig. 26). La DHAK eluye a $t_R = 111-130$ min y se separa totalmente de la contaminación por TIM.

Aplicación sintética de la DLF con regeneración in situ de ATP.

Como se comentó en el apartado dedicado al estudio del sistema multienzimático, éste tiene dos puntos clave de regulación: el mantenimiento del pH de la reacción a 7.5 para asegurar el funcionamiento del sistema de regeneración de ATP y la relación quinasa/aldolasa para minimizar la producción en exceso de DHAP y evitar así su degradación no enzimática.

Cuando aplicamos el enzima bifuncional a este sistema multienzimático es imposible modular la relación quinasa/aldolasa, que está fijada estructuralmente en 1:3. Un efecto similar podría lograrse modulando la relación cetona/aldehído. Inicialmente el sistema se ensayó con el acetaldehído (2) utilizando una relación DHA:aldehído 1:1.5, que era la relación optimizada cuando se utilizó el sistema multienzimático con Fuc1PA (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004). Cuando la reacción se llevó a cabo con 0.3 U de aldolasa y 0.1 U de quinasa, tras 22 h de reacción pudimos detectar un 20.5% de aldol con una acumulación del 37 % de DHAP y consumo total de la DHA inicial. Es decir más de un 40 % de la DHAP producida se ha degradado en el medio sin dar lugar a la formación de aldol. Al aumentar la velocidad de reacción duplicando la cantidad de enzima, conseguimos un efecto modesto ya que la formación de aldol aumentó al 31.7%, disminuyendo la acumulación de DHAP al 30.6%.

Una vez probada la relación 1:1.5 se ensayaron las siguientes relaciones DHA:acetaldehído: 1:3, 1:5 y 1:10. Los resultados obtenidos con estas tres relaciones y utilizando 1.35 U aldolasa y 0.45 U quinasa se encuentran

resumidos en la figura 58. Se puede observar que una relación 1:10 DHA:acetaldehído afecta notablemente al sistema multienzimático, concretamente al sistema de fosforilación, ya que, tras 22h de reacción no sólo la formación de aldol ha sido muy baja (del 15 %), sino que todavía queda más del 25% de la DHA sin reaccionar. Las relaciones 1:3 y 1:5 dan resultados similares, con una formación de aldol del orden del 60 % a las 22h y una acumulación de DHAP inferior al 15 %. En ambos casos, la DHA que queda sin reaccionar es inferior al 5 %. Es decir, modulando la relación cetona/aldehído conseguimos reducir el porcentaje de DHAP degradado de más del 40 % a sólo el 15 % aumentando significativamente la eficacia del sistema. De entre estas dos relaciones DHA:acetaldehído, seleccionamos para trabajar la relación 1:3, que nos permite economizar sustratos y que, a tiempos más cortos, permite que la reacción evolucione ligeramente más rápido (Fig. 58 B).

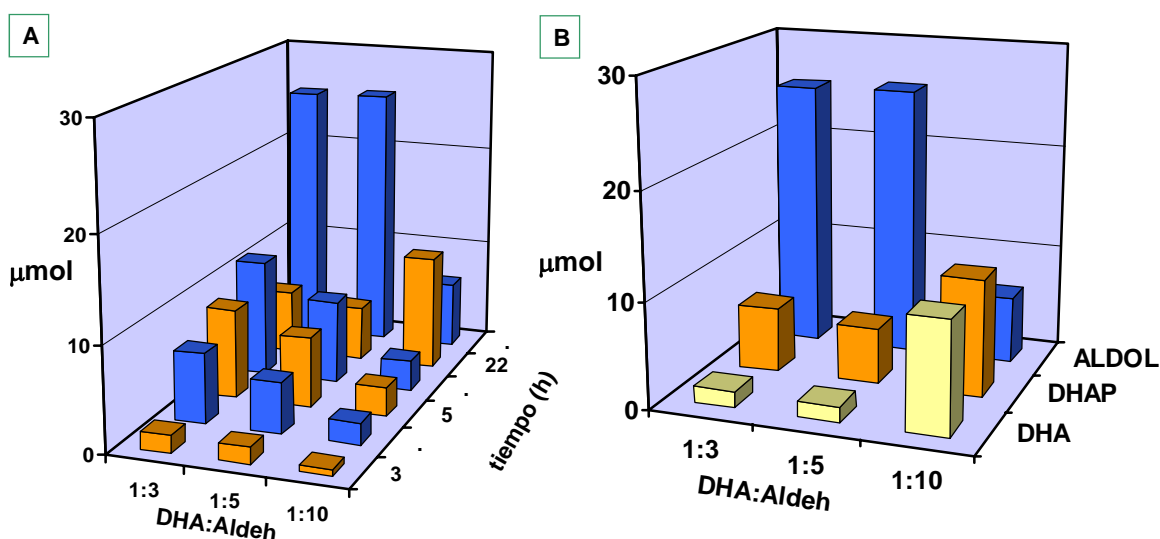


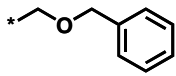
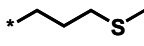
Figura 58. Estudio de la relación DHA:acetaldehído. **(A)** Evolución de la acumulación de DHAP y aldol con el transcurso de la reacción; **(B)** Relación de los distintos componentes de la reacción a tiempo 22h. DHA (gris); DHAP (naranja); aldol (azul).

Una vez optimizada la relación DHA:aldehído, se ensayaron los tres aldehídos objeto de estudio utilizando la misma cantidad de proteína (0.6 U de aldolasa y 0.2 U de quinasa). Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 13.

En los tres casos se observa un consumo de DHA superior al 90% tras las 20h de reacción, aunque la evolución de las distintas reacciones con el tiempo tiene lugar a distintas velocidades.

En el caso del acetaldehído (**2**), tras 5h se observa una acumulación de DHAP del 20.6 % con una formación de aldol del 42.4 %. Al dejar la reacción evolucionar hasta t=20h sin control del pH, el consumo de DHA supera el 95 % y la formación de aldol roza el 60 %, aunque sigue habiendo una acumulación de DHAP del 15 %.

Tabla 13. Aplicabilidad sintética de la proteína de fusión.

R	t (h)	DHA consumida (%)	DHAP acumulada (%)	Aldol (%)	Conversión No-efectiva (%)
*—CH ₃	3	-	9.5	29.8	-
	5	68.4	20.6	42.4	5.4
	20	95.1	14.5	59.3	21.3
	3	-	4.5	25.3	-
	5	40.9	0.8	29.2	10.9
	20	90.7	6.1	46.2	38.4
	3	-	13.2	28.2	-
	5	80.3	25.7	47.2	7.4
	20	95.1	22.2	64.6	8.3

En el caso del benciloxiacetaldehído (**8**), en 5h se consume un 40.9 % de la DHA inicial con un 29.2 % de formación de aldol y sin prácticamente acumularse DHAP en el medio de reacción. Al dejar evolucionar la reacción hasta las 20h sin control del pH, el consumo de DHA supera el 90 % y la formación de aldol llega al 46 %.

Cuando la reacción se realizó con el 3-(metiltio)propionaldehído (**9**), la fosforilación de DHA evoluciona hasta un 80% en 5h, dando lugar a una acumulación de DHAP en el medio del 25.7% y una formación de aldol del 47.2%. Al dejar evolucionar la reacción sin control del pH hasta las 20h, el

consumo de DHA supera el 95%, con una acumulación de DHAP del 22.2 % y una formación de aldol del 65.6 %.

En los tres casos se observa un consumo no efectivo de DHA que no se ve reflejado en la acumulación de DHAP ni en la formación de aldol. Mientras que en la reacción llevada a cabo con el aldehído **9** esta conversión “no efectiva” a las 20h es del 8.3 %, con el aldehído **2** llega a ser del 21.3% y del 38.4 % con el aldehído **8**. En los tres casos se observa que la conversión “no efectiva” de DHA a tiempos cortos es significativamente menor, de forma que pensamos que podría reducirse aumentando la cantidad de enzima, lo que haría que la reacción evolucionara más rápidamente.

La repetición de la reacción utilizando acetaldehído como sustrato y duplicando la cantidad de proteína de fusión, dio un 61.6 % de conversión de aldol en 7h con una acumulación de DHAP del 33.1% y una conversión de DHA del 97.9 %. Al dejar la reacción evolucionar sin control del pH, es decir, evolucionando hacia pHs ácidos, a las 22 h pudimos observar una formación de aldol del 74.5 % con una acumulación de DHAP del 8%. En este caso, la conversión “no efectiva” de DHA se redujo al 15.4%, con un aumento en la formación de aldol.

La caracterización de los tres aldoles generados (**2c**, **8c** y **9c**) se realizó mediante espectroscopía RMN a partir de los crudos de reacción (Dinkelbach *et al.*, 2001). En los espectros se detectó un único diaestereoisómero del aldol correspondiente.

DISCUSIÓN

Construcción y caracterización del enzima bifuncional dihidroxiacetona quinasa–fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa.

Diseño de la proteína de fusión quinasa-aldolasa.

Como hemos visto en la Introducción, a la hora de diseñar un enzima bifuncional, la elección de los elementos a fusionar y del orden en que se fusionan resulta crítico para que la proteína se exprese soluble y el plegamiento sea correcto.

La construcción diseñada en este trabajo fusiona la dihidroxiacetona quinasa de *C. freundii* CECT 4626 (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004; Sánchez-Moreno, Tesis Doctoral) con la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *S. carnosus* (Brockamp y Kula, 1990a) a través de un brazo espaciador de 5 aminoácidos (Craeto y Feng, 2000).

Uno de los principales motivos para la elección de la DHAK como representante de la función quinasa fue su disponibilidad, junto a su probada aplicabilidad en síntesis de DHAP (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004). A la hora de seleccionar el enzima representativo de la función aldolasa fue necesario tener en cuenta que las aldolasas dependientes de DHAP suelen ser diméricas o tetraméricas (Joerger *et al.*, 2000; Kroemer *et al.*, 2003; Beernink y Tolan,

1996) y su fusión directa con una proteína dimérica como la DHAK puede dar lugar a agregados macromoleculares inactivos (Bülow y Mosbach, 1991). Existen distintos ejemplos descritos en bibliografía donde la fusión de dos proteínas diméricas (Tamada *et al.*, 1994) o una proteína dimérica y otra tetramérica (Sachadyn *et al.*, 2006; Ljungcrantz *et al.*, 1989) resultan en una proteína de fusión soluble y activa. Sin embargo, la experiencia previa de nuestro grupo de trabajo, donde se había realizado una fusión entre una proteína dimérica y otra tetramérica, dio lugar a la formación de agregados macromoleculares inactivos. La fusión llevada a cabo en aquella ocasión fue entre la DHAK (dímero) y la Fuc1PA de *E. coli*, que es una proteína tetramérica de estructura cristalográfica conocida (Joerger *et al.*, 2000). La proteína de fusión resultante de esta construcción se expresó en cuerpos de inclusión, no observándose expresión en la fracción soluble. Además, a pesar de los diversos ensayos realizados de desnaturalización/renaturalización *in vitro* de estos cuerpos de inclusión no se consiguió detectar ninguna de las dos actividades. Esto podría deberse a que la construcción no resulta funcional o a que el plegamiento *in vitro* no corresponda al plegamiento que pudiese darse *in vivo* (García-García, Trabajo para la obtención del DEA, no publicado). Para evitar este tipo de problemas decidimos seleccionar la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *S. carnosus*, que ya había sido descrita como una proteína monomérica y estable frente a pH y temperatura, lo que podría indicar flexibilidad en el plegamiento (Brockamp y Kula, 1990a). Además, esta proteína ya había mostrado su aplicabilidad sintética potencial, aceptando un amplio rango de aldehídos (Brockamp y Kula, 1990b; Schoevaart *et al.*, 1999).

De los métodos de construcción de un enzima de fusión posibles descritos en la Introducción, los basados en el empleo de la PCR son los más indicados en este caso, ya que son rápidos y nos dan libertad en la elección del orden de fusión y de diseño de la secuencia conectora. Además, son los más indicados en casos como el nuestro donde no se dispone de una construcción previa en casete.

Dadas las características estructurales de la DHAK y la FBPA expuestas en Resultados y la secuencia conectora seleccionada, la construcción de fusión se puede esquematizar como N_r-**DHAK**-(Gln-Gly-Gln-Gly-Gln)-**FBPA**-C_t.

Es importante destacar que el diseño realizado para la construcción del enzima de fusión ha derivado en un biocatalizador que presenta las dos actividades de los enzimas parentales. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 14, la proteína de fusión muestra una reducción en las actividades específicas de ambas funciones respecto a los enzimas libres, de manera que la proteína de fusión muestra una actividad específica para la función aldolasa del 13% de la actividad específica de la FBPA nativa. Del mismo modo, la función quinasa presenta una actividad específica que es el 22% de la actividad específica de la DHAK nativa. Esta reducción se puede atribuir a dos componentes: por un lado puede ser debido a un efecto de la fusión sobre el plegamiento de los dominios quinasa y aldolasa; por otro lado, al aumento en el peso molecular de la proteína como consecuencia de la fusión. Si tenemos en cuenta únicamente el peso correspondiente al dominio del que medimos la actividad podemos corregir la componente del peso en la reducción de actividad específica. Así, los valores aumentan a un 35% para la función aldolasa y un 32% para la función quinasa (Tabla 14).

Tabla 14. Actividades específicas de las proteínas FBPA, DHAK y DLF.

		Actividad específica (U/mg de proteína)	Actividad específica (U/mg de dominio)
Proteínas nativas	FBPA	43.6	-
	DHAK	7.97	-
Enzima de fusión	ALDOLASA	5.76	15.36
	QUINASA	1.75	2.57

El estudio del comportamiento cinético de la proteína bifuncional nos ha permitido comprobar que la fusión no dificulta la unión de los sustratos al centro activo, ya que los valores de K_M de ninguna de las dos funciones se ve

afectado por la fusión. Además, a pesar de la disminución observada en el valor de k_{cat}/K_M del enzima de fusión, dada la altísima eficiencia catalítica de los enzimas de partida, el resultado es que el valor de k_{cat}/K_M en el orden de $10^4 \text{ min}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$ determinado para las dos actividades integrantes del enzima de fusión es suficientemente alto para su aplicación en síntesis.

Estudios estructurales de la proteína de fusión.

Efecto de la fusión sobre la estructura secundaria.

Si observamos los espectros de estructura secundaria obtenidos mediante dicroísmo circular para la DHAK, la FBPA y la DLF comprobamos que las tres muestran un comportamiento típico de α -hélice, con dos mínimos en la señal a ~ 208 y ~ 222 nm (Fig. 43). Un estudio comparativo de las tres proteínas nos permite comprobar cómo la intensidad del espectro de la proteína de fusión es intermedia a la obtenida para las dos enzimas analizadas independientemente (Fig. 59). El análisis de una mezcla equimolar DHAK:FBPA, que sería equivalente al comportamiento ideal de la proteína quimera si la fusión no ejerciera ningún efecto sobre el plegamiento, nos muestra, nuevamente, un espectro característico de α -hélice, con dos mínimos en la señal a ~ 208 y ~ 222 nm (Fig. 44). Además, en este caso, el comportamiento también intermedio al obtenido para las proteínas DHAK y FBPA (Fig. 59). Sin embargo, un análisis más detallado de los espectros de la proteína de fusión y de la mezcla DHAK:FBPA, permite observar diferencias significativas entre los espectros de ambas muestras (Fig. 59) indicando una clara diferencia en la composición de su estructura secundaria.

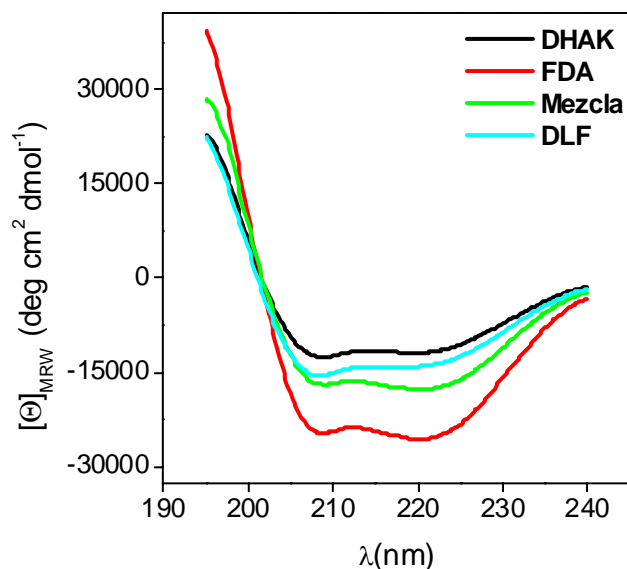


Figura 59. Estructura secundaria de las proteínas FBPA, DHAK, DLF y de una mezcla 1:1 DHAK:FBPA (mol:mol).

El análisis del contenido en estructura secundaria de las proteínas nativas nos permite hacer una estimación del comportamiento teórico de una mezcla 1:1 DHAK:FBPA (Ec.1). Como se comprueba en los datos recogidos en la Tabla 14, existe una buena correlación entre los resultados teóricos calculados para una mezcla 1:1 y los resultados experimentales obtenidos para esa mezcla. Esto quiere decir que la diferencia de comportamiento entre la mezcla 1:1 DHAK:FBPA y la DLF es debida a un efecto de la fusión, no a interacciones provocadas por la presencia de las dos proteínas en la misma muestra. La disminución en el porcentaje de α -hélice que provoca la fusión de las proteínas parentales no se reparte equitativamente entre los otros tres tipos de estructura estudiados, sino que en su mayoría se traduce en un aumento del porcentaje de β -lámina y en menor medida en el aumento de los porcentajes de giro o de estructura desordenada. Esto nos muestra que, a pesar de las precauciones tomadas a la hora de decidir el diseño de la proteína bifuncional, la unión covalente de las dos proteínas DHAK y FBPA en la proteína de fusión sí tiene un efecto sobre su plegamiento.

Tabla 14. Contenido de los distintos elementos estructurales de la proteína de fusión DLF y de una mezcla 1:1 DHAK:FBPA (mol:mol). En el caso de la mezcla 1:1 se indican tanto los resultados experimentales como los resultados teóricos calculados con la Ec. 1 a partir de los datos experimentales de las proteínas nativas.

		% α -HÉLICE	% β -LÁMINA	% GIRO	% UNRD
Mezcla 1:1	Teórico	53.39	10.86	15.72	25.75
	Experimental	52.7 \pm 2.50	8.3 \pm 0.46	15.0 \pm 1.33	24.7 \pm 1.80
Proteína de fusión	DLF	46.2 \pm 1.81	11.2 \pm 0.98	16.2 \pm 0.65	26.0 \pm 1.54

Efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria.

Un estudio de la variación de estructura secundaria frente a la temperatura nos permite observar que la proteína de fusión tiene un comportamiento similar al de la DHAK, con una transición α -hélice/ β -lámina, mientras que el comportamiento de la FBPA es el que domina en la mezcla 1:1 DHAK:FBPA, con una transición α -hélice/random coil (Fig. 60, A-D).

Este mismo paralelismo se observa si comparamos las desnaturalizaciones de las 4 muestras (DHAK Fig. 46A; FBPA Fig. 47A; DLF Fig. 50A; mezcla 1:1 DHAK:FBPA Fig. 51A). Así, podemos observar de nuevo, un comportamiento similar entre la DLF y la DHAK, donde la transición entre el estado nativo y el desnaturalizado es rápida, mientras que, el comportamiento de la FBPA es el que domina en la mezcla 1:1 DHAK:FBPA, con una transición de desnaturalización más lenta, incluso, como hemos visto, en dos posibles pasos en el caso de la FBPA.

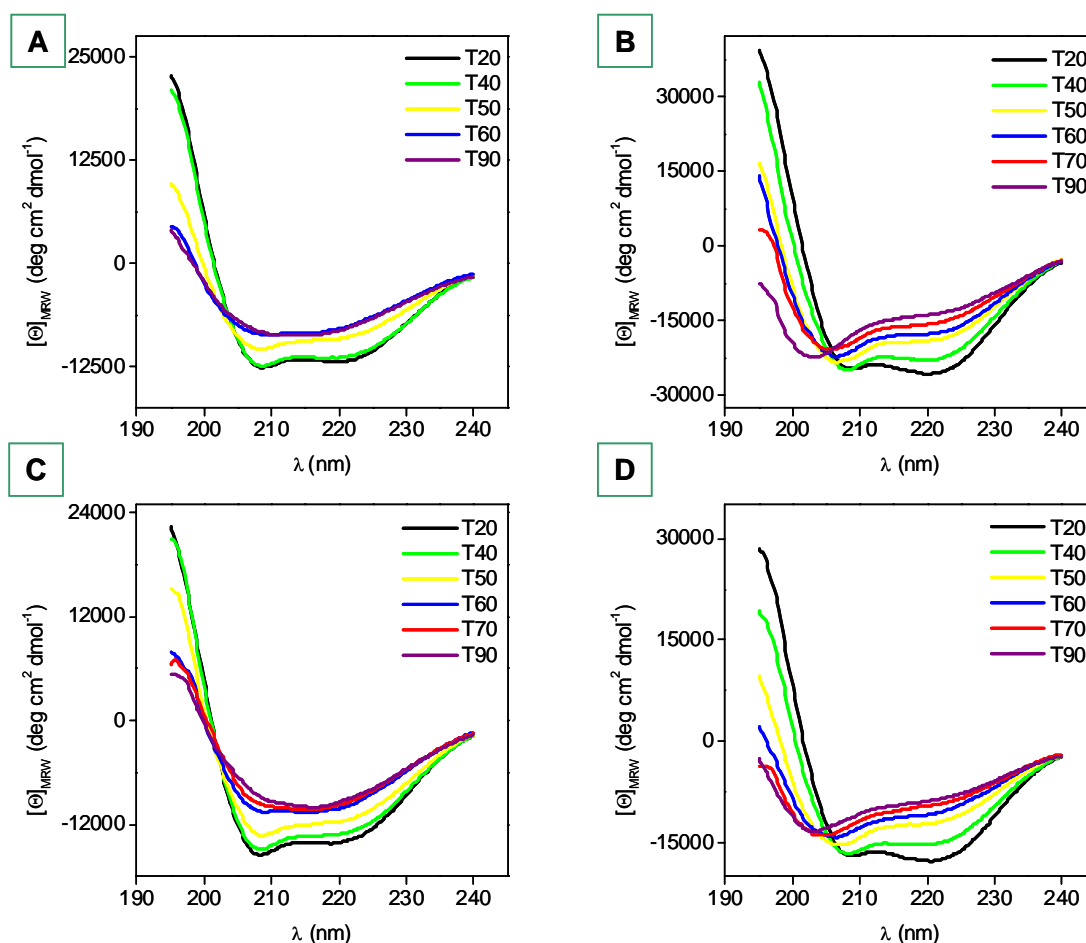


Figura 60. Evolución de la estructura secundaria con la temperatura para las proteínas: **(A)** DHAK; **(B)** FBPA; **(C)** DLF; **(D)** mezcla 1:1 DHAK:FBPA (mol:mol).

La cooperatividad de la reacción de desnaturalización de una proteína se puede medir cualitativamente por el ancho y la forma de la transición. Así, la DHAK, donde la desnaturalización tiene lugar en con una transición rápida entre dos estados (Fig. 46A), muestra una transición altamente cooperativa, propia de una proteína que se encuentra, inicialmente, en una estructura compacta y bien plegada. Por su parte, una desnaturalización no-cooperativa es señal de una estructura inicial muy flexible, parcialmente desplegada o mezcla heterogénea de distintos tipos de plegamiento. Este es el caso de la FBPA, donde la desnaturalización tiene lugar de manera lenta y progresiva (Fig. 47), con una recuperación casi completa de la estructura inicial después de enfriar la muestra (Fig. 49). Además, está descrito en la bibliografía que proteínas que muestran un desplegamiento en más de dos estados son, generalmente, más estables (Clarke *et al*, 1999). Tanto esto, como la

flexibilidad del plegamiento inicial, concuerdan con la estabilidad térmica descrita para la FBPA (Brockamp y Kula, 1990a).

El comportamiento estructural de la mezcla 1:1 DHAK:FBPA se corresponde con la suma de las dos proteínas que forman parte de la mezcla, dominada por la mayor señal de DC a 222 nm de la FBPA. Sin embargo, el comportamiento de la DLF muestra una desnaturalización con una transición rápida entre dos estados, de esta forma podemos comprobar como la fusión hace que, por efecto de la proximidad entre la quinasa y la aldolasa, se produzca cooperatividad en el desplegamiento. Esta proximidad provocada por la fusión se pierde en la mezcla 1:1 de DHAK:FBPA, observándose una desnaturalización más lenta no-cooperativa (www.ap-lab.com/circular_dichroism.html).

En cuanto a la temperatura a la cual se produce la mitad de la desnaturalización (T_{05}), podemos observar que la fusión tiene un efecto estabilizador de la proteína bifuncional respecto al comportamiento de la mezcla 1:1 DHAK:FBPA, mostrando un aumento en el valor de T_{05} (Fig. 52). Así, podemos comprobar una vez más que el comportamiento de la proteína de fusión no es sumatorio del comportamiento de las proteínas parentales DHAK:FBPA, sino que el hecho de fusionar las dos actividades enzimáticas confiere una mayor estabilidad térmica al nuevo biocatalizador.

Sin embargo, el estudio del efecto de la temperatura sobre la estructura por DC no nos permite discernir cuál de las dos funciones, quinasa o aldolasa, es la que se está viendo más afectada por la fusión. El ensayo de la estabilidad de la actividad enzimática a 45 °C nos puede dar una idea al respecto. En este ensayo, donde la incubación de las muestras se realizó a 45 °C pero la medida de actividad se realizó a temperatura ambiente, lo que se está valorando es la pérdida de actividad asociada a la desnaturalización irreversible de las proteínas.

Así, en este ensayo de estabilidad térmica, la DHAK tiene una pérdida de actividad muy acusada, siendo la proteína con menor vida media (Fig. 53). Esto concuerda con la baja capacidad de recuperación de la estructura que

habíamos podido determinar por DC (Fig. 46B). Por su parte, la gran capacidad de recuperación de la estructura que presenta la FBPA (Fig. 49), explica la estabilidad de la actividad de este enzima durante el ensayo.

La proteína de fusión muestra un comportamiento intermedio entre las dos proteínas nativas (Fig. 53), con una estabilización de la parte menos estable (la quinasa) pero una desestabilización de la parte más estable (la aldolasa). Además, la DLF presenta una recuperación del 54.1% de la estructura, medida por DC (Fig. 50B). Esta capacidad de recuperación es inferior a la que cabría esperar para una mezcla equimolar DHAK:FBPA, que recupera un 69.6% de la estructura (Fig. 51B). A la vista de los resultados de estabilidad de la actividad enzimática a 45 °C, podemos asociar la caída en la estabilidad de la actividad aldolasa de la DLF a una pérdida en la capacidad de recuperación de la estructura del dominio aldolasa en la proteína de fusión, debido a una pérdida de flexibilidad de dicho dominio. Está descrito en bibliografía que la unión covalente de una proteína grande (DHAK: 63.6 kDa) al extremo N-terminal de una proteína pequeña (FBPA: 35 kDa) puede afectar a la maduración de la estructura secundaria de la proteína que se expresa en segundo lugar, no permitiendo el correcto plegamiento de ésta (Stanislawska-Sachadyn *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de la pérdida de actividad aldolasa a 45°C, éste se ve acompañado de un aumento en la estabilidad de la función quinasa y de un claro aumento de la T_{05} de la proteína de fusión en comparación con la mezcla equimolar DHAK:FBPA.

En conclusión, el estudio del efecto de la temperatura sobre la estructura de la proteína de fusión nos permite comprobar cómo hemos construido un biocatalizador más estable frente a la temperatura desde dos puntos de vista. Por un lado, la comparación de la proteína de fusión con una mezcla 1:1 DHAK:FBPA (mol:mol) muestra un claro aumento en la temperatura a la cual se produce la mitad de la desnaturalización, T_{05} . Por otro lado, el estudio de la estabilidad de la actividad a 45 °C muestra una notable estabilización del elemento débil del sistema multienzimático. Si bien la función aldolasa de la proteína de fusión es menos estable que la FBPA, la estabilidad de las dos

funciones de la proteína de fusión es mayor que la función menos estable de las proteínas nativas, la DHAK.

Aplicación de nuevos sistemas biocatalíticos para la formación estereoselectiva de enlaces C-C.

Como hemos visto en la Introducción, las aldolasas dependientes de DHAP tienen limitada su aplicabilidad sintética debido a su gran dependencia de un sustrato caro, desde el punto de vista comercial y lábil a pHs neutros y básicos, que es el rango óptimo de trabajo para las aldolasas. Nuestro grupo de trabajo ha diseñado un sistema multienzimático que permite la formación one-pot de enlaces C-C a partir de DHA (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004). Este sistema está compuesto por tres enzimas que permiten por un lado, la fosforilación de la DHA catalizada por la DHAK de *C. freundii* con consumo de ATP y la regeneración de ese ATP catalizada por la AK de *E. coli* usando acetilfosfato como donador de fosfato. Esta regeneración permite economizar un sustrato caro como es el ATP y evita la acumulación de ADP, que es inhibidor de la DHAK. Por otro lado, el acoplamiento one-pot de una aldolasa dependiente de DHAP permite llevar a cabo la reacción aldólica de manera simultánea a la formación de la DHAP, evitando pasos intermedios de purificación.

La principal ventaja que presenta el sistema multienzimático descrito en esta memoria comparado con otros descritos en la bibliografía que también transcurren mediante fosforilación de DHA, es que el enzima que nosotros empleamos para la fosforilación de la DHA es la que presenta la mayor eficacia catalítica de cuantas hay descritas en la bibliografía.

Si comparamos nuestro sistema multienzimático con el descrito por Fessner y Sinerius (1994) basado en la glicerol oxidasa, podemos destacar que el sistema multienzimático aquí descrito permite la síntesis del aldol en un solo paso a partir de DHA, dada la compatibilidad en las condiciones de reacción de los enzimas que emplea, mientras el sistema de la glicerol oxidasa necesita, en

todas sus variantes, al menos dos pasos como consecuencia de las condiciones oxidantes del medio de reacción. Además, estas condiciones no sólo afectan al resto de enzimas involucradas en la reacción, sino que pueden afectar a la estabilidad de los aldehídos empleados como sustrato.

A la vista de los resultados obtenidos en la aplicación del sistema multienzimático con Rham1PA y Fuc1PA podemos afirmar que el sistema descrito es una herramienta muy útil para la formación de enlaces C-C, ya que ha demostrado ser un sistema muy robusto, que se puede aplicar a distintas aldolasas dependientes de DHAP y a una batería de aldehídos con diversidad estructural. Además, la posibilidad de aplicar una estrategia en un paso o dos pasos le confiere una gran versatilidad, pudiendo ajustarse a diferentes condiciones de reacción como la presencia de co-solventes o el empleo de aldehídos que sean malos sustratos de la aldolasa empleada.

A pesar de las múltiples ventajas que presenta, este sistema multienzimático presenta el inconveniente de necesitar tres enzimas, con lo que esto supone, tanto desde el punto de vista operacional como económico (Asenjo y Andrews, 2008). La construcción de un enzima bifuncional quinasa-aldolasa permite simplificar este punto, ya que el sistema multienzimático pasa a necesitar dos únicos enzimas, abaratando costes de obtención del sistema biocatalítico.

Como ya hemos visto, el sistema multienzimático general presenta dos puntos críticos de funcionamiento: el mantenimiento del pH a 7.5 para el correcto funcionamiento del sistema de regeneración de ATP y el mantenimiento de la acumulación de DHAP en valores bajos que permitan minimizar la conversión no efectiva de DHA. En el sistema multienzimático donde las funciones quinasa y aldolasa se encuentran en proteínas independientes, la acumulación de DHAP la hemos regulado optimizando la relación de actividades DHAK/aldolasa. En la aplicación del enzima bifuncional, donde la relación de actividades viene fijada por la propia construcción en 1:3 (quinasa:aldolasa), hemos conseguido el mismo efecto modulando la relación DHA:aldehído.

Otro punto a considerar es si con la fusión hemos modificado o alterado la estereoquímica de la reacción catalizada por la aldolasa. En los espectros de

RMN hemos podido comprobar que solamente se ha formado un diastereoisómero del aldol correspondiente. No hemos podido, en este momento, determinar la configuración absoluta de los nuevos centros quirales. Para ello, nos planteamos utilizar un método recientemente descrito para la determinación de la configuración absoluta de dioles 1,2 (Seco *et al.*, 2004). Este método implica la formación del correspondiente diéster con los ácidos (*R*)- y (*S*)-arilmetoxiacéticos (AMAA). Este método ha sido aplicado satisfactoriamente para la determinación de la configuración absoluta de aldoles obtenidos por condensación catalizada por prolina (Calderón *et al.*, 2005).

Está descrito que las aldolasas dependientes de DHAP son altamente estereoselectivas en la posición C-3 del aldol (la que proviene de la DHAP en la reacción aldólica), mientras que la estereoselectividad de la posición C-4 (la que proviene del aldehído en la reacción aldólica) puede depender de la estructura y estereoquímica del aldehído utilizado (Schoevaart *et al.*, 2001; Espelt *et al.*, 2003a; Espelt *et al.*, 2005). Dado que mediante RMN podemos detectar un único diastereoisómero y aceptando que la estereoquímica de C-3 es la fijada por la aldolasa (3*S*), en C-4 sólo tenemos una de las dos estereoquímicas posibles, ya que no vemos mezcla de diastereoisómeros. Dado que la FBPA de *S. carnosus* está descrita como estereoespecífica para la configuración *treo* (Dinkelbach *et al.*, 2001), asumimos que la estereoquímica del aldol obtenido es la esperada para esta aldolasa (3*S*, 4*R*) y por lo tanto la fusión no ha alterado la estereoselectividad del enzima (Fig. 61).

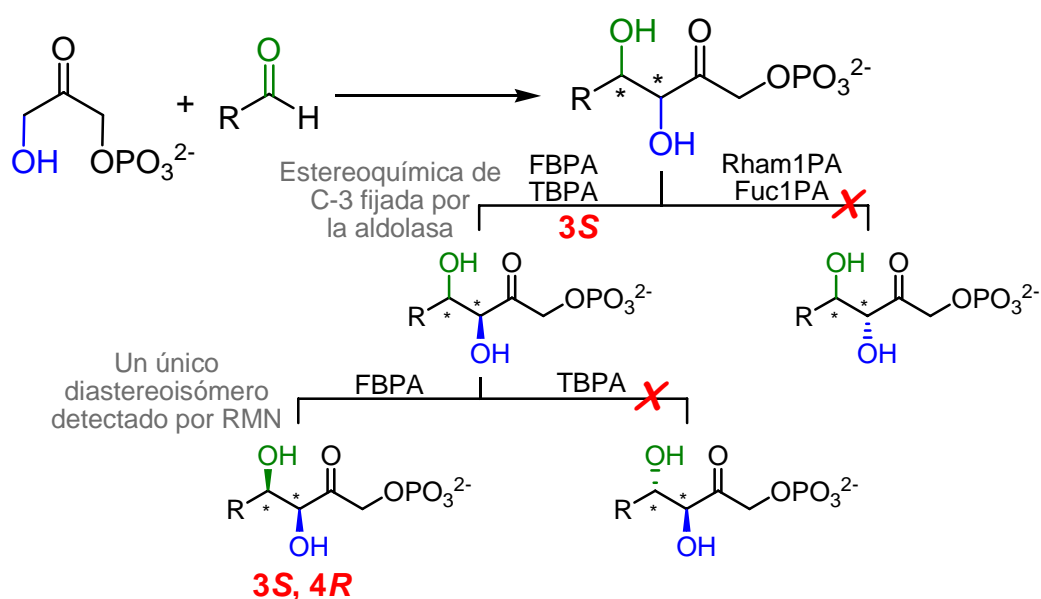


Figura 61. Asignación de la estereoquímica de los aldoles.

Hemos demostrado la aplicabilidad sintética del enzima de fusión empleando tres aldehídos estructuralmente diferentes, lo que muestra la versatilidad del enzima. Además, los estudios de RMN nos han permitido comprobar la formación del aldol de interés como un único estereoisómero, lo que muestra que la fusión no afecta la estereoespecificidad de la aldolasa.

Estudio del efecto de fusión sobre la transferencia de sustrato.

A la hora de diseñar el enzima bifuncional quinasa-aldolasa que nos permitiera simplificar el sistema multienzimático desarrollado en la primera parte de esta Tesis Doctoral buscábamos dos efectos: (i) la simplificación del sistema multienzimático reduciendo el número de enzimas; (ii) el aumento de la velocidad de la reacción global como consecuencia de la proximidad entre los centros catalíticos. Como hemos visto en los resultados, hemos conseguido los dos efectos buscados, ya que la proteína de fusión ha demostrado su aplicabilidad sintética y además, la reacción de formación de aldol tiene lugar 20 veces más rápido en los experimentos realizados con el enzima de fusión que cuando se ensayaron los enzimas libres (Fig. 55).

Para poder justificar el aumento en la velocidad de la reacción global al aplicar la proteína de fusión, podemos encontrar en la literatura dos conceptos diferentes: el efecto túnel de sustrato y el efecto de proximidad (Ovádi, 1991a,b).

Tanto el efecto túnel de un sustrato o “channeling”, como el efecto de proximidad son procesos mediante los cuales un intermedio de una reacción secuencial se transfiere de un enzima a otro sin que exista un equilibrio completo de dicho sustrato en el medio (Ovádi y Srere, 1992). Esto se puede considerar como una transferencia de sustrato “facilitada” ya que el intermedio está disponible para el segundo enzima con mayor probabilidad que si tuviera que difundir y equilibrarse con el medio de reacción, debido al aumento de la concentración efectiva del metabolito en el entorno del segundo enzima. En los dos casos, la eficiencia catalítica del proceso global aumenta sin modificar las actividades catalíticas intrínsecas de los componentes. La diferencia entre ambos procesos radica en que, para que tenga lugar el efecto túnel de sustrato es condición *sine qua non* que exista algún tipo de organización estructural del *túnel* por el que deben desplazarse los sustratos (Ovádi y Srere, 1992). Sin embargo, tanto el término “efecto de proximidad” como el término “efecto túnel de sustrato” son tratados habitualmente de manera equivalente en la literatura, debido a la falta de consenso sobre cual es el tipo de organización estructural exigible para que haya “channeling”. De hecho, la publicación de una revisión sobre la importancia biológica del efecto túnel de sustrato (Ovádi, 1991a), tuvo que ser inmediatamente aclarada en el número siguiente como consecuencia del gran número de críticas recibidas (Ovádi, 1991b).

En un principio, nosotros no podemos considerar que la fusión realizada en el enzima bifuncional genere una organización estructural del camino que debe seguir la DHAP tal que podamos asignar el aumento de la velocidad de reacción global al “channeling”. Por lo tanto, el efecto que nosotros hemos observado en el enzima de fusión no debe ser considerado en principio como efecto túnel. Además, los resultados que hemos obtenidos se pueden explicar considerando únicamente el efecto de proximidad.

En una reacción enzimática secuencial, el tiempo de tránsito es el tiempo que un metabolito necesita para pasar de un enzima al siguiente. Si no tenemos en cuenta las propiedades catalíticas de los enzimas, este tiempo de tránsito está relacionado con el tiempo de difusión. Este tiempo de difusión desde un centro activo al siguiente es proporcional a la distancia media de separación de las moléculas y viene determinado por la expresión r_E^2/D_S , donde r_E es la distancia media de separación entre las moléculas de enzima y D_S es el coeficiente de difusión del sustrato (Welch, 1977). Con la fusión de las dos proteínas hemos conseguido acortar la distancia entre los centros catalíticos de las dos funciones enzimáticas disminuyendo por tanto, el tiempo de tránsito de la DHAP de la quinasa a la aldolasa y aumentando por tanto la velocidad de la reacción global como consecuencia del efecto de proximidad.

Independientemente del término elegido para definir el efecto observado, es importante destacar que la nueva proteína de fusión consigue aumentar 20 veces la velocidad de la reacción global de formación de enlaces C-C respecto a la misma reacción catalizada con los enzimas libres. Además, es un biocatalizador flexible que permite utilizar aldehídos con diversas estructuras. Como ya hemos comentado, además, ha demostrado ser un biocatalizador más estable como hemos podido comprobar en el aumento de la temperatura de desnaturalización y en el aumento de la estabilidad de la actividad enzimática a 45 °C. Además, aunque en los aldehídos estudiados en esta memoria con el enzima de fusión no se ha dado el caso, condiciones que afecten al sistema de fosforilación, como la presencia de cosolventes o de aldehídos que interfieran con las actividades quinasa se podrían ensayar en un sistema en dos pasos, aumentando la versatilidad de enzima bifuncional quinasa-aldolasa DLF.

CONCLUSIONES

Mediante el desarrollo del sistema multienzimático para la formación estereoselectiva de enlaces C-C descrito previamente por nuestro grupo (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004), hemos demostrado que la DHAK de *C. freundii* es una herramienta eficiente para la obtención de DHAP y que su aplicación en tandem con la aldolasas dependientes de DHAP facilita enormemente el empleo de estas enzimas en la formación de enlaces C-C, ya que permite eliminar la síntesis y purificación de la DHAP.

En el trabajo desarrollado en esta Tesis hemos demostrado que este sistema multienzimático es robusto ya que se puede generalizar a las distintas aldolasas dependientes de DHAP y se puede aplicar a una amplia batería de aldehídos con diversidad estructural. El sistema permite además una gran flexibilidad operacional ya que, además de ser un sistema que permite realizar varias reacciones *one-pot*, la posibilidad de aplicar estrategias en un paso y dos pasos hace que el sistema se pueda adaptar a distintas condiciones de reacción como son la presencia de cosolventes o la utilización de aldehídos que son malos sustratos de las aldolasas.

Por otra parte, hemos diseñado y obtenido un enzima bifuncional quinasa-aldolasa que presenta, dentro de la misma cadena polipeptídica, las funciones quinasa y aldolasa unidas por un brazo espaciador. La función quinasa está representada por la dihidroxiacetona quinasa de *C. freundii* y la función aldolasa está representada por la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *Staphylococcus carnosus*. Es importante destacar que hemos conseguido una construcción donde la proteína se expresa en la fracción soluble y, sobre todo, que mantiene la actividad de las dos funciones.

La caracterización estructural del enzima de fusión nos permitió determinar que, a pesar del diseño de un brazo espaciador de 5 aminoácidos, la fusión sí ejerce un efecto sobre el plegamiento de la nueva proteína bifuncional comparado con las proteínas nativas. Este efecto se ve traducido en un descenso en el porcentaje de α -hélice y un aumento en el de β -lámina. Por otro lado, la estabilidad térmica del enzima de fusión también se ve afectada por la unión covalente de las dos proteínas. Así, la función aldolasa pierde estabilidad pero esta pérdida es compensada por una notable estabilización de la actividad quinasa, que era el elemento más inestable del sistema multienzimático. El resultado global es que la proteína de fusión presenta una T_m mayor que la que corresponde a una mezcla equimolar de las dos proteínas independientes.

El análisis del comportamiento cinético del enzima bifuncional nos ha permitido comprobar que la fusión no afecta significativamente a los valores de K_M de las dos actividades. Sin embargo, el número de recambio en las dos actividades en la proteína de fusión sufre un descenso significativo. A pesar de la disminución del valor de k_{cat}/K_M del enzima bifuncional con respecto a cada uno de los enzimas independientes, la nueva enzima de fusión mantiene una alta eficiencia catalítica (del orden de 10^4) para las dos funciones. Por otra parte, hemos comprobado que la fusión de las dos actividades catalíticas en una única cadena polipeptídica mejora las características cinéticas del sistema multienzimático como consecuencia de un efecto de proximidad de los centros activos, observándose una velocidad de formación de aldol 20 veces mayor que la observada para los enzimas independientes ensayados en las mismas condiciones.

En cuanto a la aplicación en la síntesis de enlaces C-C del nuevo enzima bifuncional, hemos demostrado su eficacia utilizando aldehídos que presentan diferentes características estructurales. Hemos demostrado que, una optimización de la relación DHA:aldehído nos permite modificar la velocidad de reacción minimizando así la conversión no efectiva de DHA. Además, hemos podido comprobar cómo la reacción global da lugar a la formación del aldol de interés de forma estereoespecífica.

BIBLIOGRAFÍA

Asenjo J, Andrews B (2008) *Challenges and trends in bioseparations*. J Chem Technol Biotechnol 83:117–120.

Ballou CE, Fischer OL (1956) *The synthesis of dihydroxyacetone phosphate*. J Am Chem Soc 78:1659-1661.

Bastida A, Fernández-Mayoralas A, Gómez Arrayás R, Iradier F, Carretero JC, García-Junceda E (2001) *Heterologous over-expression of alpha-1,6-fucosyltransferase from Rhizobium sp.: application to the synthesis of the trisaccharide beta-D-GlcNAc(1-->4)-[alpha-L-Fuc-(1-->6)]-D-GLcNAc, study of the acceptor specificity and evaluation of polyhydroxylated indolizidines as inhibitors*. Chem Eur J 7:2390-2397.

Beernink PT, Tolan DR (1996) *Disruption of the aldolase A tetramer into catalytically active monomers*. Proc Natl Acad Sci USA 93:5374-5379.

Bednarski MD, Waldmann HJ, Whitesides GM (1986) *Aldolase-catalyzed synthesis of complex C-8 and C-9 monosaccharides*. Tetrahedron Lett 27:5807-5810.

Bednarski MD, Simon ES, Bischofberger N, Fessner WD, Kim M-J, Lees W, Saito T, Waldmann HJ, Whitesides GM (1989) *Rabbit muscle aldolase as a catalyst in organic synthesis*. J Am Chem Soc 111:627-635.

Bergmeyer HU (1984) *Methods of Enzymatic Analysis* vol. 2, 3rd ed.; Verlag Chemie: Deerfield, FL.

Breuer M, Hauer B (2003) *Carbon-carbon coupling in biotransformations*. Curr Opin Biotechnol 14:570-576.

Brockamp HP, Kula MR (1990a) *Purification and characterization of a class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase from Staphylococcus carnosus*. Appl Microbiol Biotechnol 34:287-291.

Brockamp HP, Kula MR (1990b) *Staphylococcus carnosus aldolase as catalyst for enzymatic aldol reactions*. Tetrahedron Lett 31:7123-7126.

Bülöw L (1987) *Characterization of an artificial bifunctional enzyme, beta-galactosidase galactokinase, prepared by gene fusion*. Eur J Biochem 163:443-448.

Bülöw L, Mosbach K (1991) *Multienzyme systems obtained by gene fusion*. TIBTECH 9:226-231.

Calderón F, Fernández R, Sánchez F, Fernández-Mayoralas A (2005) *Asymmetric aldol reaction using immobilized proline on mesoporous support*. Adv Synth Catal 347:1395-1403.

Carlsson H, Ljung S, Bülöw L (1996) *Physical and kinetic effects on introduction of various linker regions in β -galactosidase/galactose dehydrogenase fusion enzymes*. Biochim Biophys Acta 1293:154-160.

Castillo FA, Calveras J, Casas J, Mitjans M, Vinardell MP, Parella T, Inoue T, Sprenger GA, Joglar J, Clapés P (2006) *Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine, N-alkylated derivatives and preliminary biological assays*. Org Lett 8:6067-6070.

Charmantray F, El Blidi L, Gefflaut T, Hecquet L, Bolte J, Lemaire M (2004) *Improved straightforward chemical synthesis of dihydroxyacetone phosphate through enzymatic desymmetrization of 2,2-dimethoxypropane-1,3-diol*. J Org Chem 69:9310-9312.

Charmantray F, Dellis P, Samreth S, Hecquet L (2006) *An efficient chemoenzymatic route to dihydroxyacetone phosphate from glycidol for the in situ aldolase-mediated synthesis of monosaccharides*. Tetrahedron Lett 47:3261-3263.

Cheek S, Ginalski K, Zhang H, Grishin NV (2005) *A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases*. BMC Struct Biol 5:6.

- Chen X, Liu Z, Wang J, Fang J, Fan H, Wang PG (2000) *Changing the donor cofactor of bovine α 1,3-galactosyltransferase by fusion with UDP-galactose 4-epimerase*. J BiolChem 275:31594-31600.
- Chênevert R, Lavoie M, Dasser M (1997) *Use of aldolases in the synthesis of non-carbohydrate natural products: stereoselective synthesis of asplicilin C-3-C-9 fragment*. Can. J. Chem 75: 68-73.
- Chênevert R, Dasser M (2000) *Chemoenzymatic synthesis of the microbial elicitor (-)-syringolide via a fructose 1,6-diphosphate aldolase-catalyzed condensation reaction*. J Org Chem 65:4529-4531.
- Colbran RL, Jones JKN, Matheson NK, Rozema I (1967) *A synthesis of dihydroxyacetone phosphate from dihydroxyacetone*. Carbohydr Res 4:355–358.
- Corchero JL, Villaverde A (1999) *Tolerance of Escherichia coli β -galactosidase C-terminus to different-sized fusions*. Biotechnol bioeng 64:644-649.
- Cordova A, Zou W, Dziedzic P, Ibrahim I, Reyes E, Xu Y (2006) *Direct asymmetric intermolecular aldol reactions catalyzed by amino acids and small peptides*. Chem Eur J 12:5383-5397.
- Corey EJ, Cheng XM (1989) *The Logic of Chemical Synthesis*. John Wiley & Sons: New York.
- Crans DC, Whitesides GM (1983) *A convenient synthesis of disodium acetyl phosphate for use in situ ATP cofactor regeneration*. J Org Chem 48:3130-3132.
- Crans DC, Whitesides GM (1985a) *Glycerol kinase: substrate specificity*. J Am Chem Soc 107:7008-7018.
- Crans DC, Whitesides GM (1985b) *Glycerol kinase: synthesis of dihydroxyacetone phosphate, sn-glycerol-3-phosphate, and chiral analogues*. J Am Chem Soc 107:7019-7027.

Crans DC, Kazlauskas RJ, Hirschbein BL, Wong C-H, Abril O, Whitesides GM (1987) *Enzymatic regeneration of adenosine 5'-triphosphate: acetyl phosphate, phosphoenolpyruvate, methoxycarbonyl phosphate, dihydroxyacetone phosphate, 5-phospho- α -D-ribose pyrophosphate, uridine-5'-diphosphoglucose*. Meth Enzymol 136:263–280.

Crans DC, Sudhakar K, Zamborelli TJ (1992) *Interaction of rabbit muscle aldolase at high ionic strengths with vanadate and other oxoanions*. Biochem 31:6812-6821.

Crasto CJ, Feng, Ja (2000) *LINKER: a program to generate linker sequences for fusion proteins*. Protein Engineering 13:309-312.

Daniel R, Stuerzt K, Gottschalk G (1995) *Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by Citrobacter freundii*. J Bacteriol 177:4392-4401.

Dinkelbach M, Hodenius M, Steigel A, Kula MR (2001) *Fructose-1,6-bisphosphate aldolase from Staphylococcus carnosus: selective enzymatic synthesis of ketose-1-phosphates and successive reactions to 1,3-dioxanes*. Biocatal and Biotransform 19:51-68.

Drueckhammer DG, Durrwachter JR, Pedersen RL, Crans DC, Daniels L, Wong C-H (1989) *Reversible and in situ formation of organic arsenates and vanadates as organic phosphate mimics in enzymatic reactions: mechanistic investigation of aldol reactions and synthetic applications*. J Org Chem 54:70–77.

Effenberger F, Straub A (1987) *A novel convenient preparation of dihydroxyacetone phosphate and its use in enzymatic aldol reactions*. Tetrahedron Lett 28:1641–1644

Espelt L, Clapés P, Esquena J, Manich A, Solans C (2003a) *Enzymatic carbon-carbon bond formation in water-in-oil highly concentrated emulsions (gel emulsions)*. Langmuir 19:1337-1346.

Espelt L, Parella T, Bujons J, Solans C, Joglar J, Delgado A, Clapés P (2003b) *Stereoselective aldol additions catalyzed by dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolases in emulsion systems: Preparation and structural characterization of linear and cyclic iminopolyols from aminoaldehydes*. Chem Eur J 9:4887-4899.

Espelt L, Bujons J, Parella T, Calveras J, Joglar J, Delgado A, Clapés P (2005) *Aldol additions of dihydroxyacetone phosphate to N-Cbz-amino aldehydes catalyzed by L-fuculose-1-phosphate aldolase in emulsion systems: Inversion of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde*. Chem Eur J 11:1392-1401.

Evans DA, Bartroli J, Shih TL (1981) *Enantioselective aldol condensations. 2 Erythro-selective chiral aldol condensations via boron enolates*. J Am Chem Soc 103: 2127-2129.

Evans DA, Bartroli J (1982) *Stereoselective reactions of chiral enolates. Application to the synthesis of (+)-prelog-djerassi lactonic acid*. Tetrahedron Lett 23:807-810.

Ferroni EL, DiTella V, Ghanayem N, Jeske R, Jodlowski C, O'Connell M, Styrsky J, Svoboda R, Venkataraman A, Winkler BM (1999) *A three-step preparation of dihydroxyacetone phosphate dimethyl acetal*. J Org Chem 64:4943-4945.

Fessner W-D, Sinerius G, Schneider A, Dreyer M, Schulz GE, Badia J, Aguilar J (1991) *Diastereoselective enzymatic aldol additions: L-rhamnulose and L-fuculose 1-phosphate aldolases from E. coli*. Angew Chem Int Ed Engl 30:555-558.

Fessner WD, Eyrisch O (1992) *Enzymes in organic synthesis 2. One-pot synthesis of tagatose 1,6-bisphosphate by diastereoselective enzymatic aldol addition*. Angew Chem Int Ed Engl 31:56-58.

Fessner W-D, Sinerius G (1994) *Synthesis of dihydroxyacetone phosphate (and isosteric analogues) by enzymatic oxidation: sugars from glycerol*. Angew Chem Int Ed Engl 33 209-212.

Fessner W-D (1998) *Enzyme mediated C-C bond formation*. Curr Opin Chem Biol 2:85-97.

Fessner W-D, Helaine V, (2001) *Biocatalytic synthesis of hydroxylated natural products using aldolases and related enzymes*. Curr Opin Biotechnol 12:574-586.

Gao D, McBean N, Schultz JS, Yan Y, Mulchandani A, Che W (2006) *Fabrication of antibody arrays using thermally responsive elastin fusion proteins*. J Am Chem Soc 128:676-677.

Garcia-Junceda E, Shen GJ, Sugai T, Wong C-H, (1995) *A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of three DHAP-dependent aldolases: rhamnulose-1-phosphate aldolase, fuculose-1-phosphate aldolase and tagatose-1,6-diphosphate aldolase*. Bioorg Med Chem 3:945-953.

García-Junceda E, García-García JF, Bastida A, Fernández-Mayoralas A (2004) *Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: The prodigious decades*. Bioorg Med Chem 12:1817-1834.

Gefflaut T, Lemaire M, Valentin ML, Bolte J (1997) *A novel efficient synthesis of dihydroxyacetone phosphate and bromoacetol phosphate for use in enzymatic aldol syntheses*. J Org Chem 62:5920-5922.

Gijsen HJM, Qiao L, Fitz W, Wong C-H (1996) *Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrate mimetics*. Chem Rev 96:443-473.

Gray GR, Barker R (1970) *Studies on the substrates of D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase in solution*. Biochemistry 9:2454-2462.

Guan Z, Yao W, Ye J, Dan W, Shen J, Zhang S (2007) *The construction and characterization of a bifunctional EGFP/sAPRIL fusion protein*. Appl Microbiol Biotechnol 73:1114-1122.

Hanson CH, Nishiyama Y, Paul S (2005) *Catalytic antibodies and their applications*. Curr Opin Biotechnol 16:631-636.

Hirschbein BL, Mazenod FP, Whitesides GM (1982) *Synthesis of phosphoenolpyruvate and its use in adenosine triphosphate cofactor regeneration*. J Org Chem 47:3765–3766.

Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR (1989) *Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension*. Gene 77:61-68.

Itoh N, Tujibata Y, Liu JQ (1999) *Cloning and overexpression in Escherichia coli of the gene encoding dihydroxyacetone kinase isoenzyme I from Schizosaccharomyces pombe, and its application to dihydroxyacetone phosphate production*. Appl Microbiol Biotechnol 51:193-200.

James CL, Viola RE (2002) *Production and characterization of bifunctional enzymes. Substrate Channeling in the Aspartate Pathway*. Biochem 41:3726-3731.

Joerger AC, Gosse C, Fessner W-D, Schulz GE (2000) *Catalytic action of fuculose 1-phosphate aldolase (Class II) as derived from structure-directed mutagenesis*. Biochem 39:6033-6041.

Jung SH, Jeong JH, Miller P, Wong C-H (1994). *An efficient multigram-scale preparation of dihydroxyacetone phosphate*. J Org Chem 59:7182-7184.

Kelly SM, Price NC (1997) *The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding*. Biochim Biophys Acta 1338:161-185.

Khang YH, Kim IW, Hah YR, Hwangbo JH, Kang KK (2003) *Fusion protein of Vitreoscilla hemoglobin with D-amino acid oxidase enhances activity and stability of biocatalyst in the bioconversion process of cephalosporin C*. Biotechnol Bioeng 82:480-488.

Kim J-h, Weaver R (1988) *Construction of a recombinant expression plasmid encoding a staphylococcal protein A-ricin A fusion protein*. Gene 68:315-321.

Kindermann M, George N, Johnsson N, Johnsson K (2003) *Covalent and selective immobilization of fusion proteins*. J Am Chem Soc 125:7810-7811.

- Kroemer M, Merkel I, Schulz GE (2003) *Structure and catalytic mechanism of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase*. *Biochem* 42:10560-10568.
- Li CJ (2005) *Organic reactions in aqueous media with a focus on carbon-carbon bond formations: a decade update*. *Chem Rev* 105:3095-3166.
- Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S (2005) *Comparison of affinity tags for protein purification*. *Protein Expr Purif* 41:98-105.
- Ligozzi M, Fontana R (2003) *Isolation of total DNA from bacteria and yeast*. *Afr J Biotechnol* 2: 251-253.
- Liu KK-C, Kajimoto T, Chen L, Zhong Z, Ichikawa Y, Wong C-H (1991). *Use of dihydroxyacetone phosphate dependent aldolases in the synthesis of deoxyazasugars*. *J Org Chem* 56:6280-6289.
- Ljungcrantz P, Carlsson H, Mansson MO, Buckel P, Mosbach K, Bülow L (1989) *Construction of an artificial bifunctional enzyme β -galactosidase/galactose dehydrogenase, exhibiting efficient galactose channeling*. *Biochem* 28:8786-8792.
- Lodge EP, Heathcock CH (1987) *Steric effects, as well as sigma-star-orbital energies, are important in diastereoface differentiation in additions to chiral aldehydes*. *Abstracts of papers Am Chem Soc* 193:105-ORGN.
- Look GC, Fotsch CH, Wong C-H (1993) *Enzyme-catalyzed organic-synthesis: practical routes to aza sugars and their analogs for use as glycoprocessing inhibitors*. *Acc Chem Res* 26:182-190.
- Machajewski TD, Wong, C-H (2000) *The catalytic asymmetric aldol reaction*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 39:1352-1375.
- Malleron A, David S (1996) *An enzymic approach to sequence 12-20 of amphotericin B*. *New J Chem* 20:153-159.
- Masamune S, Choy W, Petersen JS, Sita LR (1985) *Double asymmetric-synthesis and new strategy for stereochemical control in organic-synthesis*. *Angew Chem Int Ed Eng* 24:1-30.

- Mayr LM, Landt O, Hahn U, Schmidt FX (1993) *Stability and folding kinetics of ribonuclease T1 are strongly altered by the replacement of cis-proline 39 with alanine*. J Mol Biol 231:897-912.
- Meyer O, Ponaire S, Rohmer M, Grosdemange-Billiard C (2006) *Lewis acid mediated regioselective ring opening of benzylglycidol with dibenzyl phosphate: short and attractive synthesis of dihydroxyacetone phosphate*. Org Lett 8:4347–4350.
- Mizuno t, Murao K, Tanabe Y, Oda M, Tanaka T (2006) *Metal-ion-dependent GFP emission in vivo by combining a circularly permuted green fluorescent protein with an engineered metal-ion-binding coiled-coil*. J Am Chem Soc 129:11378-11383.
- Mukaiyama T (1982) *Synthetic control leading to natural-products*. ACS Symposium Series 185:21-36.
- Murata K, Uchida T, Kato J, Chibata I (1988) *Polyphosphate kinase: distribution, some properties and its application as an ATP regeneration system*. Agric Biol Chem. 52:1471-1477.
- Narita J, Okano K, Tateno T, Tanino T, Sewaki T, Sung M-H, Fukuda H, Kondo A (2006) *Display of active enzymes on the cell surface of Escherichia coli using PgsA anchor protein and their application to bioconversion*. Appl Microbiol Biotechnol 70:564-572.
- Noguchi T, Shiba T (1998) *Use of Escherichia coli polyphosphate kinase for oligosaccharide synthesis*. Biosci Biotechnol Biochem 62:1594–1596.
- Notz W, Tanaka F, Barbas III CF (2004) *Enamine-based organocatalysis with proline and diamines: the development of direct catalytic asymmetric aldol, Mannich, Michael, and Diels-Alder reactions*. Acc Chem Res 37:580-591.
- Ovádi J (1991a) *Physiological significance of metabolic channelling*. J Theor Biol 152:1-22.
- Ovádi J (1991b) *Physiological significance of metabolite channelling: Author's response to commentaries*. J Theor Biol 152:135-141.

- Ovádi J, Srere PA (1992) *Channel your energies*. TIBS 17:445-447.
- Palomo C, Oiarbide M, Garcia JM (2004) *Current progress in the asymmetric aldol addition reaction*. Chem Soc Rev 33:65-75.
- Pederson RL, Esker J, Wong C-H (1991) *An improved synthesis of dihydroxyacetone phosphate*. Tetrahedron 47:2643–2648.
- Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS (1999) *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis 20:3551-67.
- Peter LM, Dalko I (2004) *In the Golden Age of Organocatalysis*. Angew Chem Int Ed 43:5138-5175.
- Phung AN, Zannetti MT, Whited G, Fessner WD (2003) *Stereospecific biocatalytic synthesis of pancratistatin analogues*. Angew Chem Int Ed Engl 42:4821–4824
- Riley M, Abe T, Arnaud MB, Berlyn MK, Blattner FR, Chaudhuri RR, Glasner JD, Horiuchi T, Keseler IM, Kosuge T, Mori H, Perna NT, Plunkett G, Rudd KE, Serres MH, Thomas GH, Thomson NR, Wishart D, Wanner BL (2006) *Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation*. Nucleic Acids Res 34:1-9.
- Robinson CR, Sauer RT (1998) *Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis*. Proc Natl Acad Sci USA 95:5929-5934.
- Sachadyn P, Stanislawska-Sachadyn A, Kur J (2007) *A bifunctional chimeric protein consisting of MutS and beta-galactosidase*. J Biotechnol 127:229-234.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samland AK, Sprenger GA (2006) *Microbial aldolases as C-C bonding enzymes: unknown treasures and new developments*. Appl Microbiol Biotechnol 71:253-264.

Sanchez-Moreno I, Garcia-Garcia JF, Bastida A, Garcia-Junceda E (2004) *Multienzyme system for dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolase catalyzed C-C bond formation from dihydroxyacetone*. Chem Commu 1634-1635.

Sanchez-Moreno I, Iturrate L, Garcia-Garcia JF, Bastida A, Garcia-Junceda E (2008a-en preparación) *Multi-enzyme strategies for facile and efficient C-C bond formation catalysed by dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolases*.

Sanchez-Moreno I, Iturrate L, Martin-Hoyos R, Bastida A, Garcia-Junceda E (2008b-en preparación) *Biochemical characterization of the recombinant dihydroxyacetone kinase from Citrobacter freundii CECT 4626*.

Schoevaart R, van Rantwijk F, Sheldon RA (1999) *Class I fructose-1,6-bisphosphate aldolases as catalysts for asymmetric aldol reactions*. Tetrahedron Asymm 10:705-711.

Schoevaart R, van Rantwijk F, Sheldon RA (2000a) *Stereochemistry of nonnatural aldol reactions catalyzed by DHAP aldolases*. Biotechnol Bioeng 70:349–352.

Schoevaart R, van Rantwijk F, Sheldon RA (2000b) *A four-step enzymatic cascade for the one-pot synthesis of non-natural carbohydrates from glycerol*. J Org Chem 65: 6940-6943.

Schoevaart R, van Rantwijk F, Sheldon RA (2001) *Facile enzymatic aldol reactions with dihydroxyacetone in the presence of arsenate*. J Org Chem 66:4559-4562.

Schultz M, Waldmann H, Vogt W, Kunz H (1990) *Stereospecific C-C bond formation with rabbit muscle aldolase: a chemoenzymatic synthesis of (+)-exobrevicomine*. Tetrahedron Lett 31:867-868.

Schümperli M, Pellaux R, Panke S (2007) *Chemical and enzymatic routes to dihydroxyacetone phosphate*. Appl Microbiol Biotechnol 75:33-45.

Schürmann M, Sprenger GA (2001) *Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from Escherichia coli and is related to a novel group of bacterial transaldolases*. J Biol Chem 276:11055–11061.

Schürmann M, Schürmann M, Sprenger GA (2002) *Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from Escherichia coli as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxy sugars*. J Mol Catal B Enzym 19–20:247-252.

Seayad J, List B (2005) *Asymmetric organocatalysis*. Org Biomol Chem 3:719-724.

Seco JM, Quiñoá E, Riguera R (2004) *The assignment of absolute configuration by NMR*. Chem Rev 104:17-117.

Seoane G (2000) *Enzymatic C-C bond-forming reactions in organic synthesis*. Curr Org Chem 4:283-304.

Shimagaki M, Muneshima H, Kubota M, Oishi T (1993) *Chemoenzymatic carbon-carbon bond formation leading to noncarbohydrate derivative: stereoselective synthesis of pentamycin C-11-C-16 fragment*. Chem Pharm Bull 41:282-286.

Siebold C, Arnold I, García-Alles LF, Baumann U, Erni B (2003) *Crystal structure of the Citrobacter freundii dihydroxyacetone kinase reveals an eight-stranded α -helical barrel ATP-binding domain*. J Biol Chem 278:48236-48244.

Sims PA, Reed GH (2005) *Method for the enzymatic synthesis of 2-phospho-D-glycerate from adenosine 5'-triphosphate and D-glycerate via D-glycerate-2-kinase*. J Mol Catal B: Enzym 32:77-81.

Sobolov SB, Bartoszko-Malik A, Oeschger TR, Montalbano MM (1994) *Cross-linked enzyme crystals of fructose diphosphate aldolase: development as a biocatalyst for synthesis*. Tetrahedron Lett 35:7751-7754.

Sreerama N, Woody RW (2000) *Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set*. Anal Biochem 282:252-260.

- Stahl S, Hober S, Nilsson J, Uhlén M, Hygren P-A (2003) *Genetic approaches to facilitate protein purification*. Isolation and Purification of Proteins 27:95–129.
- Stanislawska-Sachadyn A, Sachadyn P, Ihle K, Sydorczuk C, Wiejacha K, Kur J (2006) *The construction of bifunctional proteins consisting of MutS and GFP*. J Biotechnol 121:134-143.
- Sugiyama M, Hong ZY, Whalen LJ, Greenberg WA, Wong C-H (2006) *Borate as a phosphate ester mimic in aldolase-catalyzed reactions: Practical synthesis of L-fructose and L-iminocyclitols*. Adv Synth Catal 348: 2555-2559.
- Sugiyama M, Hong Z, Greenberg WA, Wong C-H (2007a) *In vivo selection for the directed evolution of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhaD)*. Bioorg Med Chem 15: 5905-5911.
- Sugiyama M, Hong Z, Liang P-H, Dean SM, Whalen LJ, Greenberg WA, Wong C-H (2007b) *D-fructose-6-phosphate aldolase-catalyzed one-pot synthesis of iminocyclitols*. J Am Chem Soc 129:14811-14817.
- Sukumaran J, Hanefeld U (2005) *Enantioselective C-C bond synthesis catalysed by enzymes*. Chem Soc Rev 34:530-542.
- Tamada Y, Swanson BA, Arabshahi A, Frey PA (1994) *Preparation and characterization of a bifunctional fusion enzyme composed of UDP-galactose 4 epimerase and galactose-1-P uridylyltransferase*. Bioconjugate Chem 5:660-665.
- Tian L, Dixon RA (2006) *Engineering isoflavone metabolism with an artificial bifunctional enzyme*. Planta 224:496-507.
- Torres-Pazmiño DE, Snajdrova R, Baas B-J, Ghobrial M, Mihovilovic MD, Fraaije MW (2008) *Self-sufficient Baeyer-Villiger monooxygenases: effective coenzyme regeneration for biooxygenation by fusion engineering*. Angew Chem Int Ed 47:1-5.
- Trejo JA, Coughlin SR (1999) *The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling*. J Biol Chem 274:2216-2224.

Uhlén M, Forsberg G, Moks T, Hartmanis M, Nilsson B (1992) *Fusion proteins in biotechnology*. *Curr Opin Biotechnol* 3:363-369.

Urban RG, Dreyfus LA, Whipp SC (1990) *Construction of a bifunctional Escherichia coli heat-stable enterotoxin (STb)-alkaline phosphatase fusion protein*. *Infection and Immunity* 3645-3652.

Valentin ML, Bolte J (1995) *A convenient synthesis of DHAP from acetone*. *Bull Soc Chim Fr* 132:1167–1171

van Herk T, Hartog AF, Schoemaker HE, Wever R (2006) *Simple enzymatic in situ generation of dihydroxyacetone phosphate and its use in a cascade reaction for the production of carbohydrates: Increased efficiency by phosphate cycling*. *J Org Chem* 71:6244-6247.

Welch GR (1977) *On the role of organized multienzyme systems in cellular metabolism: A general synthesis*. *Prog. Biophys molec Biol* 32:103-191.

Whalen LJ, Wong C-H (2006) *Enzymes in organic synthesis: aldolase-mediated synthesis of iminocyclitols and novel heterocycles*. *Aldrichim Acta* 39:63-71.

Williams GJ, Domann S, Nelson A, Berry A (2003) *Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3143-3148.

Witke C, Götz F (1992) *Cloning, sequencing and characterization of the gene encoding the class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase of Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol* 175:7495-7499.

Wong CH, Whitesides GM (1983) *Synthesis of sugars by aldolase catalyzed condensation reactions*. *J Org Chem* 48:3199–3205.

Wong K-P, Tanford C (1973) *Denaturation of bovine carbonic anhydrase B by guanidine hydrochloride*. *J Biol Chem* 248:8518-8523.

Wu P-H, Giridhar R, Wu W-T (2006) *Surface display of transglucosidase on Escherichia coli by using the ice nucleation protein of Xanthomonas campestris and its application in glucosylation of hydroquinone*. *Biotechnol Bioeng* 95:1138-1147.

Xue F, Gu Z, Feng J-a (2004) *LINKER: a web server to generate peptide sequences with extended conformation*. Nucleic Acids Res 32:W562-W565.

Zagalak B, Frey PA, Karabatsos GL, Abeles RH (1966) *The stereochemistry of the conversion of D and L 1,2-propanediols to propionaldehyde*. J Biol Chem, 241:3028-3035.

Zannetti MT, Walter C, Knorst M, Fessner W-D (1999) *Fructose-1,6-bisphosphate aldolase from Staphylococcus carnosus: overexpression, structure prediction, stereoselectivity and application in the synthesis of bicyclic sugars*. Chem Eur J 5: 1882-1890.

Zhang Y, Li S-Z, Li J, Pan X, Cahoon RE, Jaworski JG, Wang X, Jez JM, Chen F, Yu O (2006) *Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells*. J Am Chem Soc 128:13030-13031.

