



Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Ingeniería de proteínas.

### Protein Engineering.

Miranda-Zaragoza, Beatriz<sup>1,2</sup>; Ramírez-Carretero, Santos<sup>2</sup> y Rodríguez-Almazán, Claudia<sup>1,2\*</sup>.

1. Departamento de Micro y Nanotecnologías, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM.
2. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM.

\*Correspondencia. Instituto de Biotecnología, Av. Universidad # 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
CP. 62210 Tel. +52 (55) 56 22 86 02, [claudiar@comunidad.unam.mx](mailto:claudiar@comunidad.unam.mx)

#### Resumen

El conocimiento de los procesos evolutivos de la vida en la Tierra, ha dado la pauta en la innovación de llevar algunos de estos procesos al laboratorio para beneficio de la humanidad, como es la replicación de ADN y la síntesis de proteínas. El ADN contiene la información necesaria para la producción de una proteína. En el siglo pasado, se comenzaron a sentar las bases teóricas y experimentales para replicar ADN en el laboratorio, generando una de las técnicas experimentales fundamentales en la biología molecular, la reacción en cadena de la polimerasa (“*Polymerase Chain Reaction*”, PCR). A partir de la cual se comenzaron a implementar otras técnicas como la mutagénesis y la evolución dirigida, que finalmente forman parte de la Ingeniería de proteínas. La Ingeniería de proteínas consiste en modificar una proteína en un solo residuo de aminoácido, en una región, eliminando o insertando un fragmento de otra proteína, o fusionando dos proteínas, todo esto a partir de modificar la secuencia de ADN, con la finalidad de obtener una proteína con mejores características que la proteína inicial.

*Palabras claves:* proteínas, evolución dirigida, mutagénesis.

#### Abstract

Knowledge of evolutionary processes of life on Earth has given the guideline in the innovation of carrying out some of these processes to the laboratory for the benefit of humanity, as is DNA replication and protein synthesis. DNA contains the information necessary for production of a protein. In the last century, the theoretical and experimental bases were established to replicate DNA in the laboratory, originating a fundamental technique in molecular biology, the polymerase chain reaction (PCR). After this technique, other methods began to implement such as mutagenesis, directed evolution, which finally became part of protein engineering. Protein engineering consists of modifying a protein in a single amino acid, in a region, eliminating a region, inserting a fragment of another protein, or fusing two proteins, all this from the modification of the sequence of DNA, the finality is to obtain an improved protein.

*Keywords:* proteins, directed evolution, mutagenesis.

## Introducción

Las proteínas son las biomoléculas más abundantes en todos los seres vivos. La diversidad funcional de estas biomoléculas es abrumadora; las podemos encontrar como enzimas, anticuerpos, proteínas estructurales, de transporte, entre otras, que cumplen una función altamente específica en los sistemas vivos [1].

En estructura, todas siguen el mismo esquema, son largas cadenas de aminoácidos (cadena polipeptídica) dispuestos en una secuencia lineal. Los aminoácidos que conforman las proteínas varían de acuerdo con las propiedades de sus cadenas laterales (grupos R). A partir de estos aminoácidos se puede sintetizar una inmensa variedad de diferentes tipos de moléculas proteicas [1, 2].

Las proteínas presentan cuatro niveles estructurales [1, 3]:

- *Estructura primaria*: consiste en la secuencia de aminoácidos. Dependiendo del orden, número y tipo de aminoácidos, la proteína puede adoptar varias formas.
- *Estructura secundaria*: las interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de aminoácidos contiguos tienden a plegar la cadena en una estructura repetida, como la hélice alfa o la hoja beta.
- *Estructura terciaria*: las interacciones entre los grupos R de los aminoácidos distantes da como resultado el plegamiento global de la cadena polipeptídica, que a menudo es de forma globular.
- *Estructura cuaternaria*: interacciones entre dos o más polipéptidos para formar la conformación nativa de una proteína.

Durante la evolución de la vida en la Tierra, los cambios en la estructura primaria (mutaciones) son determinantes para la existencia de la alta variedad de proteínas, así como de sus funciones. Podemos encontrar proteínas con estructura secundaria y terciaria similar, mientras que la estructura primaria puede diferir. La sustitución de un aminoácido determinado por otro puede alterar la molécula, y con ello sus propiedades físico- químicas, e incluso su función [1, 3].

Con el descubrimiento de la estructura del ADN y el proceso de su replicación, y el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en

inglés), dieron la pauta para poder modificar a las proteínas, lo que abre el campo de la Ingeniería de proteínas [4, 5].

La Ingeniería de proteínas es un conjunto de técnicas cuyo objetivo es la alteración intencional de la estructura primaria de una proteína, para una mejor comprensión de la relación entre secuencia de aminoácidos y un nivel estructural superior, la relación estructura función, o el desarrollo de una variante mejorada en el contexto de su uso comercial [6].

La Ingeniería de proteínas es un área multidisciplinaria, se apoya de la bioinformática, biología estructural, genómica, bioquímica y biología molecular. Su fundamento radica en el conocimiento de los procesos de replicación del ADN, la transcripción (síntesis de ARNm) y traducción (síntesis de proteínas) de la información genética. Cambios en la secuencia de subunidades (nucleótidos) de un fragmento de ADN que contiene la información necesaria para producir una proteína (gen), resultan en una mutante [7, 8]. Este gen se introduce en una célula procariota o eucariota [6, 9]; la célula produce o sintetiza a la proteína mutada o nueva variante, la cual se purifica (la proteína se separa de todos los componentes de la célula) para analizar su estructura, función y características físico químicas (ver el artículo "*Purificación de proteínas*" en esta revista).

### Replicación del ADN

La información que dicta la estructura de las proteínas que se encuentran en los organismos, está codificada en moléculas conocidas como ácidos nucleicos, que a su vez están formados por cadenas largas de nucleótidos. Un nucleótido está formado por tres subunidades: un grupo fosfato, un azúcar de cinco carbonos y una base nitrogenada [10–12].

El azúcar de un nucleótido puede ser ribosa o desoxirribosa, que contiene un átomo de oxígeno menos que la ribosa. La ribosa es el azúcar en los nucleótidos que forman ácido ribonucleico (ARN) y la desoxirribosa es el azúcar en los nucleótidos que forman ácido desoxirribonucleico (ADN). Hay cinco bases nitrogenadas diferentes en los nucleótidos, dos de ellas, adenina y guanina, tienen una estructura de dos anillos y se conocen como bases púricas. Las otras tres, citosina, timina y uracilo, tienen una estructura de anillo único y se conocen como bases pirimídicas. La adenina, la guanina y la citosina se encuentran tanto en el ADN como en el ARN, mientras que la timina se encuentra sólo en el ADN y el uracilo sólo en el ARN.

La función del ARN es transcribir el mensaje genético presente en el ADN y traducirlo a proteínas [12–14]. El ADN es el portador del mensaje genético, es una molécula de dos cadenas enrollada sobre sí mismas, formando una doble hélice propuesta por Watson y Crick. Cada cadena está formada por secuencias de desoxirribonucleótidos, adenina (A), citosina (C), timina (T) y guanina (G). Las dos cadenas se complementan entre sí, la A se une con una T por medio de dos puentes de hidrógeno, la C se aparea con una G mediante tres puentes de hidrógeno, estabilizando la estructura secundaria del ADN. Cada cadena tiene un extremo 5' y uno 3' y las dos cadenas se encuentran interaccionando en sentido antiparalelo, es decir, una ve de sentido 5' a 3' y la otra de 3' a 5' [11, 12, 13, 15].

La replicación de ADN en la célula se realiza, de manera general, de la siguiente manera [11–13]: La enzima helicasa separa las dos hebras al romper puentes de hidrógeno y genera la horquilla de replicación (iniciación de la replicación). Cada cadena de la horquilla es una hebra molde, a partir de la cual se crea una cadena complementaria, obteniéndose dos ADNs idénticos a partir de un templado. La enzima primasa inicia el proceso reconociendo una región específica del ADN y sintetizando un fragmento corto de ARN (oligonucleótido, *primer* o cebador) con secuencia complementaria a esta región específica del ADN. El fragmento de ARN deja expuesto un 3'-OH para que la enzima ADN polimerasa III se una al oligonucleótido y comience a incorporar desoxirribonucleótidos (dNTPs) para crear la nueva cadena, esta enzima sólo puede incorporar dNTPs en el sentido 5' a 3'. Esto tiene la ventaja de sólo usar un oligonucleótido. Mientras que para que se lleve la replicación en la cadena retrasada, la ARN primasa sintetiza varios oligonucleótidos que sirven de iniciadores para que la ADN polimerasa III sintetice de forma discontinua la cadena complementaria mediante la generación de fragmentos de ADN denominados como fragmentos de Okazaki. La ADN polimerasa I elimina todos los oligonucleótidos de ARN mediante su actividad exonucleasa 3' a 5' y rellena también estos espacios con desoxinucleótidos mediante su actividad polimerasa 5' a 3'. La enzima ADN ligasa une los fragmentos, obteniendo dos cadenas idénticas de ADN. Finalmente, la enzima topoisomerasa ayuda al plegamiento de la estructura de la doble hélice [11, 12, 15].

### Reacción en cadena de la polimerasa (“Polimerase Chain Reaction”, PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una simulación en el laboratorio de lo que sucede en

la célula cuando se sintetiza o replica el ADN. El objetivo de esta técnica es amplificar millones de copias de ADN (amplicones) y se realiza de la siguiente manera [4, 5, 16] (Figura 1):

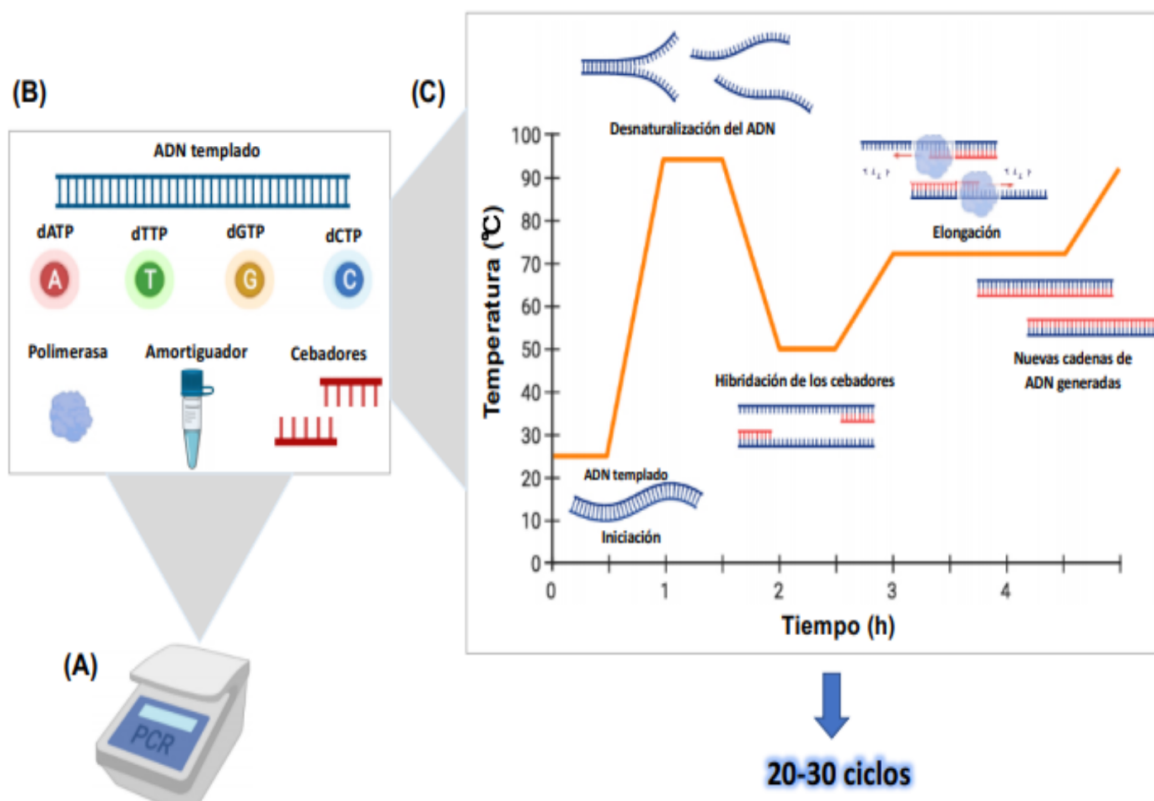
Se inicia con un fragmento de ADN o templado y la enzima termoestable (actividad a temperatura 95°C) Taq polimerasa (ADN polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*) y su cofactor cloruro de magnesio (1.5 mM), cataliza la generación de una hebra monocatenaria de ADN. Los oligonucleótidos, iniciadores o cebadores (0.1 a 0.5  $\mu$ M de cada cebador), de un tamaño entre 20 y 30 nucleótidos, se unen a la cadena de ADN para ser reconocidos por la polimerasa. Se usan dos oligonucleótidos, uno con dirección 5' a 3' (“*forward*”, misma cadena que el ADN) y otro con dirección opuesta (“*reverse*”, con secuencia complementaria al ADN) para limitar la región de interés. Los dinucleótidos (dNTPs) (10 mM de cada uno) son las unidades para formar una nueva cadena de ADN. El ambiente químico para que se lleve a cabo la reacción lo proporciona un amortiguador óptimo (Tris-HCl 10 mM, pH 8.4, KCl 50 mM) para la función de la ADN polimerasa. En algunas ocasiones se usan otros aditivos en toda esta mezcla de reacción, esto es dependiendo de la complejidad de la secuencia de ADN, esto es, si se cuenta con alto porcentaje de guaninas y citosinas, se usa dimetil sulfóxido (DMSO) (10%, reduce la estructura secundaria del ADN), formamida (estabiliza la estructura secundaria de ADN) o albúmina sérica bovina (BSA) (aumenta la eficiencia de la PCR, capta iones y otros inhibidores de la Taq polimerasa). La reacción es procesada en un equipo llamado termociclador, el cual realiza ciclos de temperaturas determinadas. El primer paso es la separación o desnaturalización de la doble cadena de ADN a temperatura de 94°C, durante 1 a 5 minutos, para romper los puentes de hidrógeno. El siguiente paso es la alineación (unión) de los oligonucleótidos mediante puentes de hidrógeno con las zonas complementarias en la cadena de ADN, esto se realiza a una temperatura definida, entre 40°C y 60°C la cual dependerá del tamaño y secuencia del oligonucleótido. Después, el paso de la extensión se lleva a cabo a 72°C, durante 60 segundos, generando los amplicones. En la extensión, la ADN polimerasa se une en la región del ADN donde se alinearon los oligonucleótidos y comienza a sintetizar una cadena de ADN en dirección 5' a 3', la incorporación de nucleótidos estabiliza la unión de los oligonucleótidos con la cadena del ADN. En este primer ciclo se obtendrán nuevas cadenas dobles de ADN, las cuales serán el templado para el siguiente ciclo. Estos pasos se repiten varias veces (de 25 a 30 veces o ciclos) para generar, de manera exponencial ( $2^n$ ), grandes

cantidades de los amplicones. Conforme se van usando los reactivos de la reacción, la síntesis de ADN decrece. Al final de los ciclos, se tiene un paso a 72°C, para que la Taq polimerasa sintetice todos los fragmentos que quedaron incompletos.

Los resultados de esta reacción se visualizan por una electroforesis horizontal en geles de agarosa (agarosa 1%, bromuro de etidio 0.5 µg/mL). Las muestras se preparan en un medio con glicerol, para incrementar la densidad de las muestras y que permanezcan en el pozo del gel. Durante la electroforesis las muestras se visualizan con un colorante, previamente añadido en la muestra, que puede ser bromofenol o xilenocianol. La migración del ADN será hacia el polo positivo debido a que su carga es negativa. Para detectar el ADN en el gel, se

usa bromuro de etidio, el cual se intercala en las hebras de ADN, emite fluorescencia al ser radiado con rayos UV. En el gel también se incorpora una muestra de marcadores de peso molecular, que consisten en moléculas de ADN con peso molecular definido (número de pares de bases) y servirán de guía para determinar aproximadamente el peso de los amplicones de ADN.

La técnica de PCR tiene grandes ventajas, es una técnica simple, sensible (detecta cantidades hasta nanomolares de ADN), específica, rápida y versátil. En cuanto a las aplicaciones, se usa en la identificación de genes [17], diagnóstico molecular [18], identificación de especies taxonómicas [19], en ciencia forense [20], genética de poblaciones [21], y otras.



**Figura 1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** A. La reacción se realiza en un termociclador, donde se programarán diferentes temperaturas que serán repetidas en ciclos durante la replicación o síntesis de ADN. B. Para realizar una PCR se requiere del ADN o templado, desoxinucleótidos (dNTPs), cebadores u oligonucleótidos, amortiguador, ADN polimerasa. C. Ciclo de la PCR donde se realizan las tres etapas principales de la reacción, desnaturalización del ADN (entre 95°C y 97°C), alineamiento de los cebadores por temperatura (50°C y 60°C), elongación de la cadena nueva de ADN (72°C, temperatura óptima para la actividad de la ADN polimerasa, finalmente se obtienen dos cadenas dobles de ADN que serán el templado de un nuevo ciclo. Figura realizada en BioRender.com

## Mutagénesis

La técnica de mutagénesis es una técnica muy poderosa que permite realizar cualquier cambio en la secuencia de ADN, si esta secuencia contiene la información necesaria para sintetizar una proteína, se origina una variante o mutante. El cambio en la secuencia de ADN consiste en modificar un nucleótido o un codón (mutagénesis sitio dirigida) o un fragmento de la secuencia (deleción o inserción) [22–25].

La mutagénesis sitio dirigida, o diseño racional, inicia con la determinación del aminoácido a modificar o mutar. En esta técnica es esencial usar ADN polimerasa con actividad de exonucleasa 3' a 5' (por ejemplo, Vent, Phusion, KOD), para corregir mutaciones no deseadas durante la amplificación del ADN. Los oligonucleótidos se diseñan de un tamaño mayor a 35 pares de bases, con 10 a 15 nucleótidos de alineamiento exacto al templado en ambos extremos. Por lo general, el oligonucleótido debe contener en el extremo 3' citosina o guanina, con un 40% máximo de contenido total de GC. En una primera PCR se genera un amplicón que se usará como mega oligonucleótido en una segunda PCR. Esta segunda PCR se usará para el diseño de un segundo oligonucleótido el otro extremo del ADN templado (Figura 2A). Finalmente, el producto de PCR mutagénico se analiza en un gel de agarosa, separándolo del templado y otros productos no específicos. El PCR mutagénico se purifica y se clona en un vector que se introduce a una célula (procariota o eucariota), donde se producirá la proteína (Figura 2A) [22, 24, 26].

Otras técnicas muy recurrentes para el diseño de mutantes es extensión por sobreposición o solapamiento [5, 27]. Esta técnica se usa para la generación de deleciones o inserciones en una secuencia de ADN, con el mismo fundamento que la mutagénesis sitio dirigida y solo varía en el diseño de oligonucleótidos.

Cuando se desea “cortar” una región en la secuencia de ADN, uniendo los extremos que quedan libres, se realiza una deleción. En el primer paso se amplifican dos fragmentos (primera y segunda PCR), en cada par se cuenta con un oligo (secuencia mayor a 30 oligonucleótidos) cuyo extremo contiene la modificación que se desea y se puede solapar (secuencia de aproximadamente 9 oligonucleótidos). En una tercera PCR, estos fragmentos se usan como un solo templado, junto con dos oligos diseñados para un PCR común (20 a 30 nucleótidos), uno será complementario en el extremo 5' de un mega oligonucleótido y el otro se podrá alinear en el

extremo 3' del segundo mega oligocleótido [5, 26] (Figura 2B).

Para adicionar una secuencia de nucleótidos en un gen (inserción) o diseñar una quimera, al igual que en la deleción, también se emplea la extensión del solapamiento por PCR, la diferencia es el diseño de los oligonucleótidos que incluyen la secuencia que se desee incorporar, la cual será la región de solapamiento en la PCR, considerando el tamaño de oligonucleótidos mayor a 30 nucleótidos (dependiendo del tamaño del inserto) [5, 25, 27]. Para el resto del protocolo se sigue el mismo fundamento que para una deleción (Figura 2C y 2D).

## Herramientas bioinformáticas

Existen diversas herramientas bioinformáticas mediante las cuales se puede realizar un análisis de los diferentes niveles estructurales de la proteína, determinando la región o aminoácidos más convenientes para mutar, si es una mutación puntual se puede determinar el efecto de la mutación (costo energético, cambio de energía libre). Se puede comparar la secuencia de aminoácidos con otras proteínas (definiendo identidad, similitud, sitios conservados, etcétera), a nivel de estructura primaria existe la posibilidad de predecir algunos parámetros físico químicos (punto isoeléctrico, peso molecular, hidrofobicidad, coeficiente de extinción molar, etc.) de la mutante a obtener, análisis de la estructura secundaria y terciaria para reconocer las interacciones que se modificarían al realizar una mutagénesis, modificación de la carga en la superficie de la proteína, alineamientos de estructura terciaria de la mutante a diseñar comparada con otras proteínas, entre otros parámetros (Tabla 1).

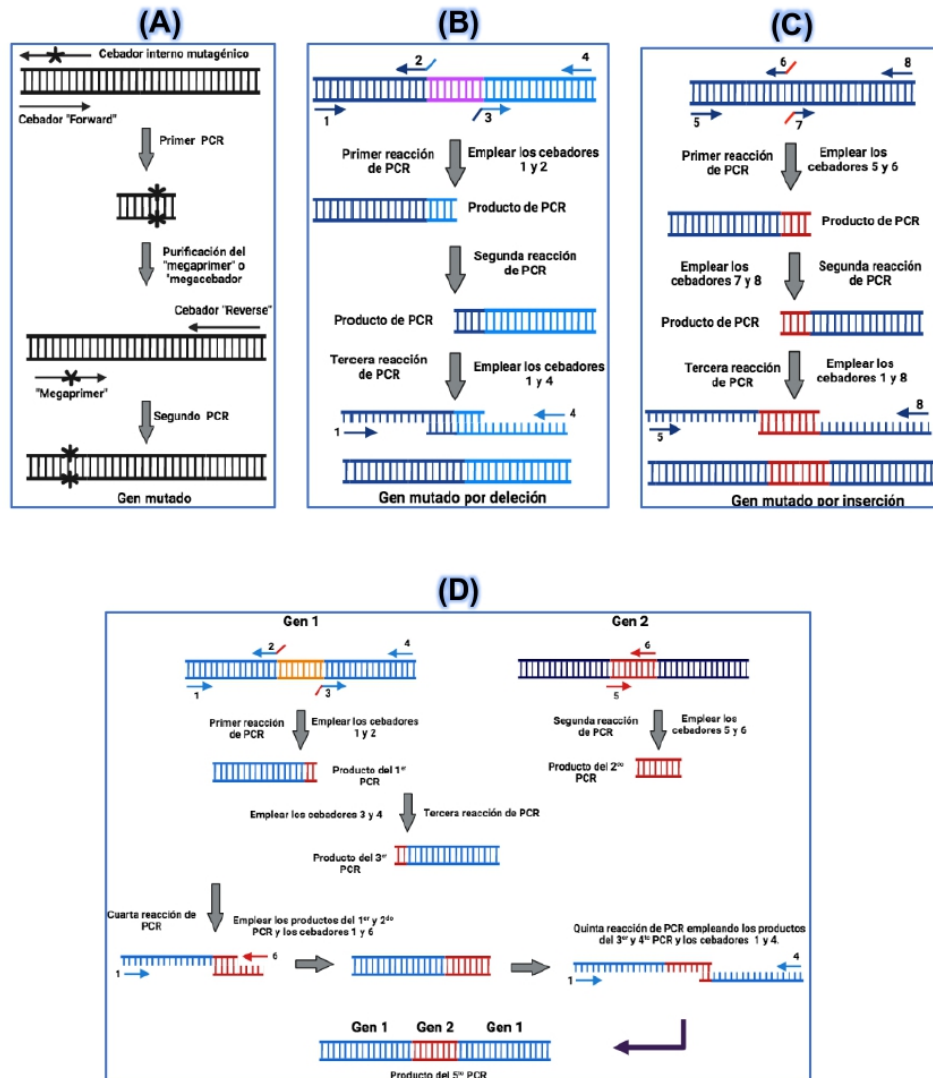
## Evolución dirigida

La evolución dirigida en proteínas es una técnica que se fundamenta en el cambio de su estructura primaria (mutantes) con repercusión en niveles superiores de su estructura, dando origen a proteínas con características físico químicas diferentes a la proteína de la cual se partió (proteína silvestre). Así como en la evolución de los seres vivos donde sobrevive el más apto ante los cambios del ambiente (selección natural), en la evolución dirigida se busca obtener proteínas con optimización en su estructura y función [5, 28, 29].

En la evolución dirigida, el cambio en la secuencia del gen que codifica para una proteína puede ser de manera aleatoria (“*random mutagenesis*”, en inglés), lo que resulta en un número de millones de mutantes

conformando una biblioteca mutagénica. La selección a las proteínas con propiedades determinadas bajo condiciones relevantes [30].

limitación en esta técnica es la necesidad de estandarizar un método de alta resolución que permita



**Figura 2. Representación esquemática de diferentes métodos de mutagénesis sitio dirigida o sitio específica por PCR.** A. En la mutagénesis sitio dirigida, se llevan a cabo dos rondas de PCR, en la primera se genera un amplicón (no mayor a 60 oligonucleótidos) con la modificación (\*) en la secuencia de ADN, este amplicón se purifica y se usa como mega oligonucleótido o cebador en una segunda PCR, con un oligonucleótido en el extremo 3' para amplificar un segundo amplicón (AND mutagénico). Mutación por deleción (B) o inserción (C), se realiza mediante extensión por sobreposición basada en PCR. Esta técnica también puede ser empleada en la generación de quimeras al intercambiar dominios entre proteínas homólogas (D). Figura realizada en BioRender.com

Para realizar una mutagénesis al azar de una proteína, se basa en el principio de una PCR, y para generar errores en la secuencia (cambios o mutantes) se requiere de una ADN polimerasa de baja fidelidad, con ausencia de actividad de exonucleasa 3' a 5', y mantener un desbalance en la cantidad de nucleótidos. Los productos que se obtienen de la PCR se clonan a un vector para poder introducirse a una célula, donde

se expresarán las proteínas mutadas o nuevas variantes. Cada hebra doble que se genera representa una mutante, por lo que al final de la PCR se espera tener una biblioteca de  $10^6$ -  $10^{10}$  mutantes [5, 8, 29, 30].

**Tabla 1. Softwares utilizados en el análisis e ingeniería de proteínas (8)**

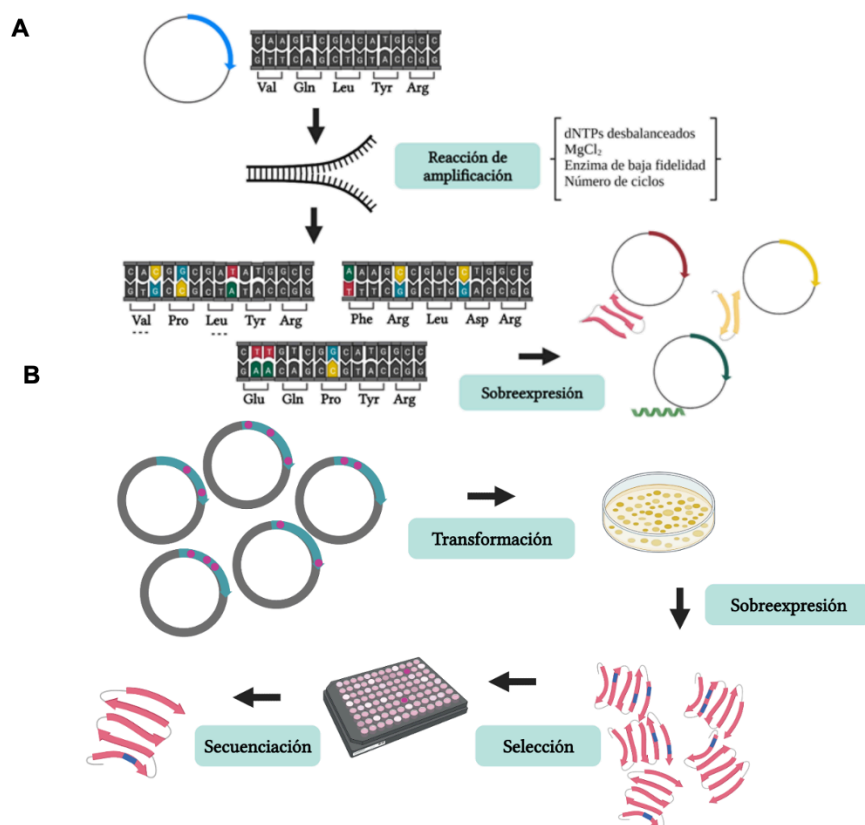
Nivel estructural	Softwares		
	Traducción ADN a proteína	Análisis del marco de lectura	Oligonucleótidos
	A partir de la secuencia de nucleótidos se obtiene la secuencia primaria de la proteína	Se analizan posibles marcos de lectura, además de predecir los sitios de restricción	Diseño de oligonucleótidos a partir de la secuencia de ADN de interés
ADN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expasy: Translate tool</li> <li>• EMBOSS: Transeq, Sixpack, Backtranseq</li> <li>• BioLign</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NCBI: ORFfinder</li> <li>• Bioinformatics: ORF finder</li> <li>• BioLign</li> <li>• WatCut</li> <li>• Rsite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer designing tool</li> <li>• Primer-BLAST</li> <li>• GeneFisher2</li> <li>• Primer3</li> </ul>
	Base de datos	Alineamiento de secuencias	Parámetros fisicoquímicos
	Colección de secuencias primarias de proteínas con datos teóricos y experimentales	Comparación de dos o más secuencias	Predicción de la composición, masa, pI, solubilidad, Tm
Proteína: Estructura primaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UniProt</li> <li>• Swiss-Prot</li> <li>• Protein Information Resource (PIR)</li> <li>• NCBI</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lalign</li> <li>• SIM</li> <li>• BLAST</li> <li>• ClustalW</li> <li>• Clustal Omega</li> <li>• MAFFT</li> <li>• T-Coffee</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compute pI/Mw tool ExPASy</li> <li>• PEPSTATS (EMBOSS)</li> <li>• Peptide Molecular Weight Calculator (GenScript)</li> <li>Tm Predictor</li> <li>• ESPRESSO</li> <li>• PROMPT</li> <li>• PIR</li> </ul>
	Base de datos	Predicción	Dominios y motivos
	Recopilación de secuencias secundarias a partir de datos experimentales	Con base en la estructura primaria se propone la conformación en estructura secundaria	Determinación teórica de los posibles dominios y motivos estructurales
Proteína: Estructura secundaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein secondary structure database (PSS)</li> <li>• 2dSS-UPMC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• JPred4</li> <li>• RaptorX</li> <li>• PredictProtein 2013</li> <li>• PROTEUS2</li> <li>• PSIPRED</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DynDom</li> <li>• Motif Scan</li> <li>• InterPro</li> <li>• MOTIF</li> <li>• Pfam</li> </ul>

**Tabla 1. Softwares utilizados en el análisis e ingeniería de proteínas.** *Continuación.*

	Base de datos	Modelado por homología	Validación de modelos
	Compilación de estructuras tridimensionales, obtenidas por técnicas como cristalografía de rayos X, Criomicroscopía y NMR	Obtención de un modelo tridimensional por homología o por métodos Ab initio	Análisis de la estructura obtenida, ángulos, interacciones y distancias propuestas
Proteína: Estructura terciaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein Data Bank</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Robetta</li> <li>• I-TASSER</li> <li>• SWISS-MODEL</li> <li>• Modeller</li> <li>• CPHmodels</li> <li>• GalaxyWEB:</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ProSA-web</li> <li>• SAVES</li> <li>• WHAT IF</li> <li>• ERRAT</li> <li>• PROCHECK</li> <li>• Verify3D</li> </ul>

Referencia [8]

La biblioteca debe caracterizarse, es decir, determinar el número de mutaciones por cada mil nucleótidos, regiones donde predominan las mutantes, y número de células transformadas y que mantienen el gen mutado (Figura 3A).



**Figura 3. Generación de una biblioteca mutante mediante evolución dirigida.** A) Técnica de evolución dirigida. En diferentes colores se muestran los pares de bases mutados, en líneas punteadas se señalan las mutaciones silenciosas. B) Proceso de selección en una biblioteca. En círculos magenta se esquematiza la ubicación de las mutantes dentro del plásmido. Figura realizada en BioRender.com



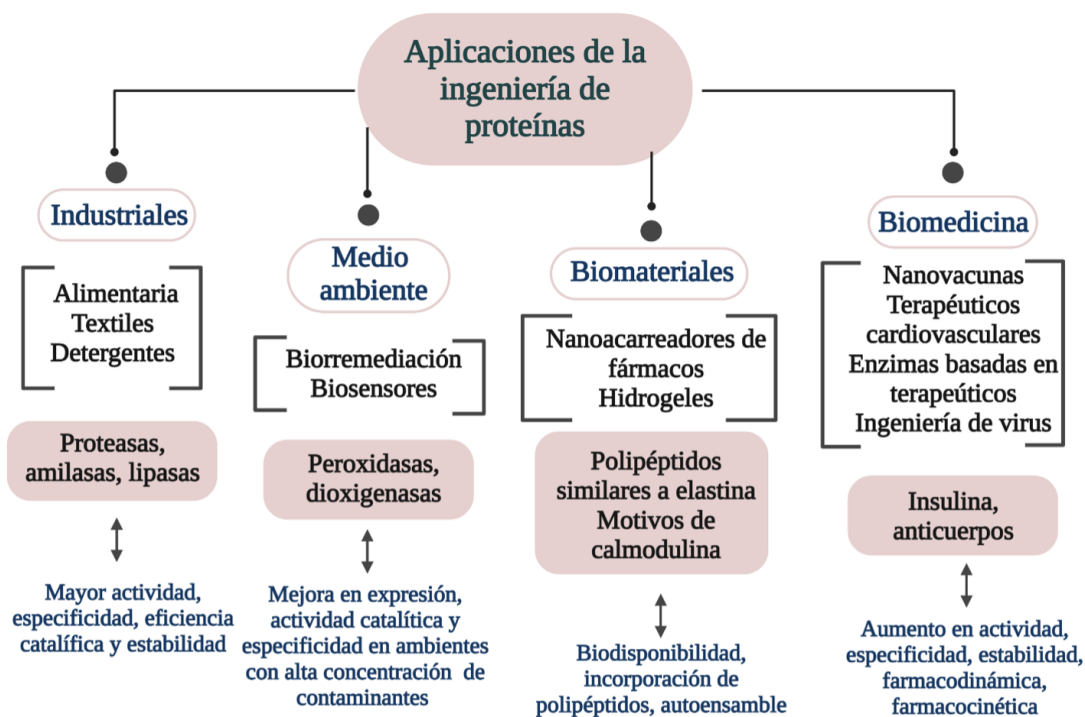
Es fundamental determinar la característica por la cual se elegirán las variantes, a partir de esto, se estandarizarán las condiciones de selección para que sólo las proteínas mejoradas puedan identificarse mediante una propiedad bioquímica específica. En la evolución dirigida de proteínas, este paso se convierte en una limitante, ya que debe ser un método sencillo, reproducible, económico, rápido, y con la capacidad de analizar cientos de variantes en poco tiempo (Figura 3B) [31, 32].

### Aplicaciones de la Ingeniería de proteínas

La gran demanda de las enzimas en la industria, biomedicina, biotecnología y nanotecnología

desencadenó el desarrollo de diversos métodos para generar proteínas optimizadas en su función y estructura.

La modificación de una proteína ha tenido impacto en el mejoramiento del fenotipo de organismos [33], en la terapéutica para un mejor control sobre la farmacocinética y farmacodinámica [34], el desarrollo de nuevos materiales poliméricos basados en proteínas [35], la industria de los alimentos con el mejoramiento de enzimas [36], en el diseño de biosensores [37], entre otras (Figura 4).



**Figura 4. Ingeniería de proteína y sus aplicaciones.** Las principales aplicaciones de la Ingeniería de proteínas se enfocan en cuatro áreas: industriales, medio ambiente, biomateriales y biomedicina [8]. Figura realizada en BioRender.com.

### Referencias

- Buxbaum, E. (2007) Fundamentals of protein structure and function, Springer, New York, NY
- Buxbaum, E. (2007) Amino acids. in Fundamentals of Protein Structure and Function (Buxbaum, E. ed), pp. 3–11, Springer US, Boston, MA, 10.1007/978-0-387-68480-2\_1
- Branden, C. I., and Tooze, J. (2012) Introduction to Protein Structure, Garland Science
- Ghannam, M. G., and Varacallo, M. (2021) Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. in StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), [online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/> (Accessed May 10, 2021)
- Park, D. J. (ed.) (2011) PCR Protocols, Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, NJ, 10.1007/978-1-60761-944-4
- Bornscheuer, U. T., and Höhne, M. (eds.) (2018) Protein Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Springer New York, New York, NY, 10.1007/978-1-4939-7366-8
- Arndt, K. M. (ed.) (2007) Protein engineering protocols, Methods in molecular biology, Humana Press, Totowa, NJ
- Poluri, K. M., and Gulati, K. (2017) Protein Engineering Techniques, SpringerBriefs in Applied Sciences and

- Technology, Springer Singapore, Singapore, 10.1007/978-981-10-2732-1
9. Bilal, M., Iqbal, H. M. N., Guo, S., Hu, H., Wang, W., and Zhang, X. (2018) State-of-the-art protein engineering approaches using biological macromolecules: A review from immobilization to implementation view point. *International Journal of Biological Macromolecules*. 108, 893–901
  10. Fredrick, K., and Ibba, M. (2009) PROTEIN SYNTHESIS. *Nature*. 457, 157–158
  11. Cooper, G. M. (2000) DNA Replication. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9940/> (Accessed May 10, 2021)
  12. Geftter, M. L. (1975) DNA Replication. *Annual Review of Biochemistry*. 44, 45–78
  13. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th Ed., Garland Science
  14. Bryant, J. A., Moore, K., and Aves, S. J. (2001) Origins and complexes: the initiation of DNA replication. *Journal of Experimental Botany*. 52, 193–202
  15. DePamphilis, M. L. (2000) Review: Nuclear Structure and DNA Replication. *Journal of Structural Biology*. 129, 186–197
  16. Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., de Souza, P. R. E., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., and Crovela, S. (2009) Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol.* 40, 1–11
  17. Huang, H.-S., Tsai, C.-L., Chang, J., Hsu, T.-C., Lin, S., and Lee, C.-C. (2018) Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 24, 1055–1063
  18. Ishige, T., Murata, S., Taniguchi, T., Miyabe, A., Kitamura, K., Kawasaki, K., Nishimura, M., Igari, H., and Matsushita, K. (2020) Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. *Clin Chim Acta.* 507, 139–142
  19. Gonzales-Siles, L., Salvà-Serra, F., Degerman, A., Nordén, R., Lindh, M., Skovbjerg, S., and Moore, E. R. B. (2019) Identification and capsular serotype sequencing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Med Microbiol.* 68, 1173–1188
  20. Sherier, A. J., Kieser, R. E., Novroski, N. M. M., Wendt, F. R., King, J. L., Woerner, A. E., Ambers, A., Garofano, P., and Budowle, B. (2020) Copan microFLOQ® Direct Swab collection of bloodstains, saliva, and semen on cotton cloth. *Int J Legal Med.* 134, 45–54
  21. Gkagkavouzis, K., Karaiskou, N., Katopodi, T., Leonardos, I., Abatzopoulos, T. J., and Triantafyllidis, A. (2019) The genetic population structure and temporal genetic stability of gilthead sea bream *Sparus aurata* populations in the Aegean and Ionian Seas, using microsatellite DNA markers. *J Fish Biol.* 94, 606–613
  22. Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G., and Galas, D. J. (1989) A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17, 6545–6551
  23. Theophilus, B. D. M., and Rapley, R. (eds.) (2011) *PCR Mutation Detection Protocols, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 10.1007/978-1-60761-947-5
  24. Bachman, J. (2013) Site-directed mutagenesis. *Methods Enzymol.* 529, 241–248
  25. Lee, J., Shin, M.-K., Ryu, D.-K., Kim, S., and Ryu, W.-S. (2010) Insertion and Deletion Mutagenesis by Overlap Extension PCR. in *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition* (Braman, J. ed), pp. 137–146, *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 10.1007/978-1-60761-652-8\_10
  26. Braman, J. (ed.) (2010) *In Vitro Mutagenesis Protocols: Third Edition, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 10.1007/978-1-60761-652-8
  27. Forloni, M., Liu, A. Y., and Wajapeyee, N. (2018) Creating Insertions or Deletions Using Overlap Extension Polymerase Chain Reaction (PCR) Mutagenesis. *Cold Spring Harb Protoc.* 10.1101/pdb.prot097758
  28. Pál, C., Papp, B., and Lercher, M. J. (2006) An integrated view of protein evolution. *Nature Reviews Genetics.* 7, 337–348
  29. Packer, M. S., and Liu, D. R. (2015) Methods for the directed evolution of proteins. *Nature Reviews Genetics.* 16, 379–394
  30. Zeymer, C., and Hilvert, D. (2018) Directed Evolution of Protein Catalysts. *Annual Review of Biochemistry.* 87, 131–157
  31. McCullum, E. O., Williams, B. A. R., Zhang, J., and Chaput, J. C. (2010) Random mutagenesis by error-prone PCR. *Methods Mol Biol.* 634, 103–109
  32. Ren, C., Wen, X., Mencius, J., and Quan, S. (2019) Selection and screening strategies in directed evolution to improve protein stability. *Bioresources and Bioprocessing.* 6, 53
  33. Marcheschi, R. J., Gronenberg, L. S., and Liao, J. C. (2013) Protein engineering for metabolic engineering: current and next-generation tools. *Biotechnol J.* 8, 545–555
  34. Tobin, P. H., Richards, D. H., Callender, R. A., and Wilson, C. J. (2014) Protein Engineering: A New Frontier for Biological Therapeutics. *Curr Drug Metab.* 15, 743–756
  35. Tirrell, D. A., Fournier, M. J., and Mason, T. L. (1991) Protein engineering for materials applications. *Current Opinion in Structural Biology.* 1, 638–641
  36. Kapoor, S., Rafiq, A., and Sharma, S. (2017) Protein engineering and its applications in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 57, 2321–2329
  37. Radomska, A., Singhal, S., and Cass, T. (2006) Protein Engineering for Biosensors. in *Body Sensor Networks* (Yang, G.-Z. ed), pp. 89–115, Springer, London, 10.1007/1-84628-484-8\_3



**DRA. CLAUDIA RODRÍGUEZ  
ALMAZÁN**

**ID ORCID: 0000-0002-8586-2317**

Bióloga de la Facultad de Ciencias, UNAM; obtuvo su Maestría en Ciencias por el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, al realizar investigación relacionada con toxinas formadoras de poro de anémona. Obtuvo su Doctorado en Ciencias Biomédicas, en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM; en el área de físico-química y termodinámica del plegamiento y estabilidad de enzimas. Realizó una estancia posdoctoral en el Instituto de Biotecnología, UNAM, mecanismos de acción de toxinas formadoras de poro de bacterias.

Desde el año 2010 es Investigadora Asociado del Instituto de Biotecnología, UNAM. Actualmente en comisión en el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM. Ha sido mentora de alumnos de licenciatura, maestría y doctorado. Tiene múltiples publicaciones en revistas indizadas. Ha participado de forma constante como docente en cursos de posgrado y en divulgación de la ciencia.

Tiene a su cargo de dos líneas de investigación:

1) Toxinología de anémonas. Las anémonas tienen la capacidad de producir veneno mediante

estructuras celulares llamadas nematocistos. Debido a la complejidad que se tiene para la obtención del veneno de anémona, las ciencias ómicas han abierto grandes perspectivas para este campo. Esta línea de investigación es conducida en dos vertientes, el estudio ómico del veneno de la anémona *Anthopleura dowii* y la identificación de toxinas formadoras de poro (TFP) por métodos de bioquímica clásica. Las TFPs forman monómeros en solución que se pueden unir a la membrana plasmática, cambiando su conformación a un estado oligomérico al interaccionar con lípidos como la esfingomielina y colesterol, presentando una selectividad con el primero. Dos aplicaciones principales le han sido otorgadas a las toxinas formadoras de poro de anémona: el diseño de inmunotoxinas como posibles herramientas en la terapia de cáncer, y el diseño de biosensores basados en nanoporos.

2) Ingeniería de enzimas de bacterias extremófilas. El cuidado del ambiente dio pauta para implementar estrategias que deben ser consideradas en los procesos químicos y que tuvieran el menor impacto posible en el ambiente, a lo que se le nombró química verde. Uno de los objetivos de la química verde es el uso de catalizadores, que pueden ser sensibles a condiciones extremas de temperatura y pH, entornos en los cuales gran parte de los procesos industriales se desarrollan. En este sentido, las lacasas han surgido como enzimas de gran interés en la industria, debido a que no solamente son una excelente alternativa en la química verde al llevar a cabo reacciones acopladas, también engloban aplicaciones en un gran número de procesos industriales, como industria del papel, control de la contaminación ambiental, industria alimentaria, biosensores, industria textil y farmacéutica. En esta línea estudiamos a las lacasas bacterianas y mediante Ingeniería de proteínas mejoramos sus características catalíticas para su aplicación en el diseño de biosensores.