

00551

10



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

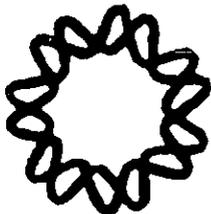
**REGENERACION ENZIMATICA DE UNA VARIANTE  
MONOMERICA DE LA ENZIMA Triosafosfato  
Isomerasa DE *Trypanosoma brucei* MEDIANTE  
MUTAGENESIS AL AZAR.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

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

**BIOL. VICTOR RIVELINO JUAREZ GONZALEZ**



ABRIL 2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## DEDICATORIAS

Dedico muy especialmente esta tesis a la memoria de mi abuelita Lucía Sánchez, agradeciéndole de todo corazón que me haya dado una madre muy especial, así como todos los momentos que compartimos en familia.

Agradezco a mi madre Eloisa González Sánchez, por el apoyo siempre fiel e incondicional para que continúe hacia adelante en mi profesión. Gracias mamá por todo lo que me has enseñado. Te quiero mucho. Nunca dejes de luchar, yo siempre te estare apoyando en todo.

Agradezco a mis hermanos Rafael Juárez, Mario Alberto Juárez, Guadalupe Juárez y Juana Juárez por ser como son y por la gran estima que se tienen y que comparten conmigo. Los quiero mucho. Al igual que a Aldair Lara, Arturo Lara y a toda la familia Lara Román. A Gloria le deseo todo mejor al igual que a su familia. A la familia Mejía le agradezco su apoyo en todos los momentos difíciles en los cuales me han ayudado.

Agradezco muy profundamente a Elia Diego García por todo el incalculable cariño y amor que me brindas, gracias a tu apoyo moral e intelectual que me ofreciste incondicionalmente, gracias Elia por ayudarme a superar todos los momentos difíciles y obstáculos por los que pasamos, te agradezco infinitamente tus valiosos comentarios y ayuda para la realización de este trabajo. Gracias a la familia Diego por tener una hija ejemplo a seguir.

Gracias a Renato León por que juntos superamos todos los momentos difíciles por los que fuimos azotados contra viento y marea, gracias por brindarme tu amistad y por invitarme a esas salidas a las montañas.

Agradezco a mis compañeros de generación por su enorme amistad y los reventones formados y pido disculpas a los lesionados durante el Slam (baile muy frecuente y necesario en nuestras fiestas quizás para liberar el estrés).

Gracias a la familia González Caballero por compartir grandes momentos y grandes consejos, cuidense mucho. Gracias por su gran hospitalidad.

Gracias a la señora Juana Ferrer por la amistad que nos une y por sus valiosos consejos, gracias por preparar los medios de cultivo, parte muy importante para la realización de los experimentos.

Gracias a todos mis amigos del Centro de Fijación del Nitrogeno UNAM. Muy especialmente al Dr. Jesús Arellano, a la Dra. Svetlana, Juan Mauricio Tellez, Ramón Suárez, Dr. Miguel Lara, Alberto Camas, Dra. Sonia Silvente, Verónica Quintero y Alejandro García. Porque todos son unas personas maravillosas.

Gracias a los Maskas por la amistad que me brindaron invaluablemente y por el campeonato de foot ball y el bicampeonato de Basket ball que ganamos. También gracias al equipo de Volley ball las aguilas por el bicampeonato logrado.

Gracias por las experiencias compartidas y su inseparable amistad a la Malaria En nombre de la canción, La banda Bostik, El haragán y compañía, Interpuesto, Trolebus, Next y LirandRoll, por difundir el Rock nacional en todo el mundo.

Gracias al grupo del trago por la amistad que forjamos y por los manjares que disfrutamos en la cocina cada día, quiero decirles que todos mejoraron su sazón. Juan Castro, Gabriel Sandoval, Martin Peralta y Aris.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mi comité tutorial por sus acertados comentarios para la realización de este trabajo: Dr. Xavier Soberón Mainero, Dr. Agustín López Munguía, Dr. Enrique Merino y Dra. Gloria Saab Rincón.

Gracias a mi comité revisor de tesis por sus valiosa sugerencias: Dra. Gloria Saab Rincón, Dra. Gloria Soberón Chávez, Dr. David Romero Camarena, Dr. Alejandro Fernández y Dr. Eduardo Horjales.

Gracias a la Dra Gloria Saab y al Dr. Xavier Soberón, por permitirme conocer a la triosafosfato isomerasa de *T. brucei* y a la evolución dirigida. Gracias a su gran ayuda e importantes comentarios.

Gracias a la M en C. Elia Diego García por sus valiosos comentarios y a la ayuda incondicional en la parte de la generación de la cepa *tpi-* de *E. coli*, así como en los alineamientos múltiples de las proteínas.

Gracias al Dr. Humberto Flores y a la Dra. Sylvie Leborgne en la parte de la generación de la cepa de *E. coli*.

Agradezco a la Dra. Brenda Valderrama por sus valiosos comentarios e invaluable amistad.

Gracias al Dr. Joel Osuna por sus interesantes comentarios e invaluable ayuda en los experimentos de la evolución dirigida por mutagénesis al azar.

Gracias a Ricardo Cano por su excelente amistad y por su ayuda en los alineamientos de las proteínas.

Gracias a la unidad de secuenciación del IBT especialmente a Rene Hernández y Maricela Olvera por su ayuda en la secuenciación de los genes.

Gracias al Biól. Filiberto Sánchez por su asistencia técnica y por su valiosa amistad.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización del trabajo de tesis.

Gracias a la UNAM y al Instituto de Biotecnología de la UNAM por formarme.

## ABREVIATURAS

aa	aminoácido (s)
Ala	alanina
Amp	ampicilina
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
ATP	adenosina 5'-trifosfato
Cm	cloramfenicol
Cys	cisteína
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
D.O.	densidad óptica
EMBL	European Molecular Biology Laboratories
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GAP	gliceraldehído-3-fosfato
Glu	ácido glutámico
Gly	glicina
His	histidina
hrs	horas
Ile	isoleucina
Kb	Kilopares de bases
Km	kanamicina
Km <sup>R</sup>	resistencia a kanamicina
KV	kilovolts
LB	Luria - Bertani
Lys	lisina
min	minutos
MM	medio mínimo
monoTIM	monómero de Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
npt II	gene que codifica para la neomicina fosfotransferasa
NPT II	neomicina fosfotransferasa
nt	nucleótido
O/N	toda la noche
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PGH	fosfoglicolato hidroxamato
Phe	fenilalanina
PM	peso molecular
Pro	prolina
seg	segundos
Ser	serina
tD	tiempo de duplicación
Thr	treonina
TIM	Triosafosfato isomerasa
<i>tpi</i>	gene que codifica para la TIM
Tyr	tirosina
UV	luz ultravioleta
wt TIM	TIM dimérica de <i>Trypanosoma brucei</i>

## I. RESUMEN

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima clave en la glucólisis debido a que es la responsable de la isomerización reversible de los azúcares dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato. La ruptura de la fructosa 1,6-bifosfato por la aldolasa da lugar a la formación de gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato; esta última tiene que ser isomerizada a gliceraldehído-3-fosfato para continuar la vía glucolítica hasta la formación de piruvato. El piruvato es modificado posteriormente a acetil CoA para obtener energía en el ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa. La TIM se encuentra representada en todos los organismos en los que se ha buscado y en la mayoría de los casos actúa como dímero. Sin embargo, en *Trypanosoma brucei*, a través de ingeniería de proteínas, se generó una mutante monomérica (monoTIM) la cual es estable, pero presenta parámetros catalíticos muy por debajo a los encontrados en la enzima dimerica (Borchert et al., 1994). Mediante evolución dirigida, generamos dos mutantes monoméricas, las cuales presentan una mayor actividad que la enzima monoTIM que les dió origen. Ambas mutantes son capaces de complementar la cepa de *Escherichia coli* VEJM101 (*tpi*-) formando colonias de mayor tamaño que las formadas por la enzima monoTIM en condiciones de medio selectivo. Al analizar las cinéticas de crecimiento, las mutantes fueron capaces de mostrar velocidades de crecimiento mayores a la presentada por monoTIM en medio selectivo. Las mutantes monoméricas son 2 triples mutantes a nivel de aminoácidos, las cuales fueron seleccionadas en condiciones distintas: De la condición de medio mínimo sin casaminoácidos, se obtuvo una clona llamada E, la cual tiene los siguientes cambios: S43P, T44A y A179T, mientras que la otra clona fue seleccionada de la condición de medio mínimo con casaminoácidos, presentando los siguientes cambios: S43P, T44S y N208S llamada V. Dichas mutantes comparten mutaciones en las posiciones 43 y 44. La presencia de prolina (Pro) en la posición 43 en ambas mutantes monoméricas se encuentra al inicio del asa o loop 2 (al final de la beta 2) de tal forma que la Pro puede rigidizar este loop provocando la estabilización del asa 1 (asa que está en movimiento constante por lo que no es visible en el cristal de monoTIM). Al estabilizarse el asa 1 (el cual contiene la Lys 13, que es un aminoácido importante en el posicionamiento de los residuos catalíticos), el sustrato es posicionado correctamente en el sitio activo y esto provoca el incremento en la catálisis de la reacción. El hecho de encontrar coincidentemente mutadas las posiciones 43 y 44 en ambas mutantes, sugiere que estos son los cambios que contribuyen en mayor medida al aumento en la actividad. Sin embargo, se tendrían que segregar las mutaciones ocurridas en otras posiciones lejanas para entender su papel en la actividad, debido a que se han identificado en proteínas TIM interacciones no covalentes distantes del sitio activo que muestran importancia en la estabilidad de dichas proteínas. Como ejemplo de

estas interacciones puede mencionarse el puente salino entre los residuos Arg 191 y Asp 227 en la formación de la cavidad de TIM observada en ausencia de sustrato (Wierenga et al., 1992). Esta interacción también se encuentra presente en ambas mutantes, sólo que la mutante E, seleccionada del medio mínimo sin casaminoácidos además puede tener una nueva interacción no covalente en la posición A179T que podría formar un puente de hidrógeno con aminoácidos aledaños. La mutante E al ser seleccionada presentó un mayor crecimiento de colonia que la clona V proveniente de la selección en medio mínimo con casaminoácidos. Las cinéticas de crecimiento con medio mínimo y el análisis de los experimentos de complementación en cajas con medio mínimo de las clonas seleccionadas, pudo corroborar en ambos casos que la mutante E es capaz de crecer en menor tiempo que las colonias que contienen el otro gene mutado.

La selección consiste en el uso de una cepa cuyo gene *tpi* no es funcional (VEJM101). Al entrar la glucosa a la vía glucolítica a través de una serie de reacciones enzimáticas, se forma una molécula de dihidroxiacetona fosfato y una molécula de gliceraldehído-3-fosfato. Mientras que el gliceraldehído-3-fosfato puede continuar hacia la formación de piruvato, la dihidroxiacetona fosfato, se acumula si no hay una TIM funcional. Finalmente, su acumulación da lugar a el uso de otra vía que produce metilglioxal, el cual es tóxico y las células mueren por el efecto inhibitorio en la replicación, transcripción y síntesis de proteínas (Krymkiewiez et al., 1971).

## II. INTRODUCCION

La glucólisis es la vía metabólica por la que la glucosa se transforma a través de una serie de intermediarios a piruvato, con la producción de 2 moles de ATP/mol de glucosa. Esta secuencia de 10 reacciones enzimáticas es probablemente la vía metabólica mejor conocida. Desempeña un papel clave en el metabolismo energético al proporcionar una parte importante de la energía utilizada por la mayoría de los organismos y preparar a la glucosa para su degradación oxidativa. En condiciones aeróbicas, el piruvato formado en la glucólisis es oxidado aún más por el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa hasta  $\text{CO}_2$  y agua. Mientras que en condiciones anaeróbicas, el piruvato es transformado en lactato como producto final reducido, mediante el proceso de la fermentación. La glucosa penetra en la mayoría de las células a través de un transportador específico que la translada desde el exterior de la célula hasta el citosol. Las enzimas de la glucólisis están situadas en el citosol, región en la cual son activas. La glucólisis transcurre en dos fases: La fase I (reacciones 1-5) es la fase de preparación en la que la glucosa es fosforilada y fragmentada, dando lugar a dos triosas: Dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y Gliceraldehído-3-fosfato (GAP). Este proceso consume dos ATPs, en lo que constituye una especie de inversión de energía. La fase II (reacciones 6-10), es la fase donde sólo uno de los productos de la ruptura aldólica, el GAP continúa a lo largo de la vía glucolítica, de tal forma que DHAP requiere ser isomerizada a GAP, formándose dos moléculas de GAP, las cuales se convierten a piruvato con la producción neta de cuatro ATPs. Por consiguiente el rendimiento neto de la glucólisis es de dos ATPs por molécula de glucosa después de sustraer las dos moléculas de ATP consumidas en la fase I (Voet y Voet, 1989).

### 2.1 Triosafosfato isomerasa (TIM)

La Triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima esencial en la glucólisis (Knowles, 1991), la cual cataliza la interconversión reversible de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3 -fosfato (GAP). Sólo el GAP continúa la vía glucolítica (figura 1), por lo que la acción de la enzima es esencial para la vía glucolítica, ya que de acumularse la DHAP se forma metilglioxal, compuesto tóxico para la célula (Krymkiewiez et al., 1971). Dicha enzima actúa como dímero en la mayoría de los casos (Borchert et al., 1994) y está formada por dos subunidades idénticas de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos (Wierenga et al, 1992; Walley, 1973).

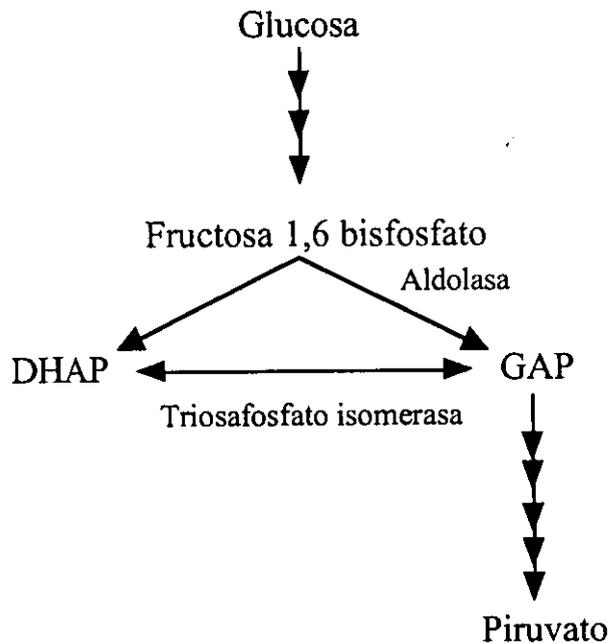


Figura 1. La degradación de la glucosa a través de la vía glucolítica para la formación de dos moléculas de piruvato. Se resalta la reacción que lleva a cabo la triosafosfato isomerasa para la producción de dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato.

Cada subunidad de este dímero presenta un dominio estructural tipo barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, con un corazón central de 8 hebras  $\beta$  paralelas (beta 1 hasta la beta 8), cubiertas en su exterior por 8  $\alpha$ -hélices (hélice 1 a la hélice 8). Las hebras  $\beta$  y las hélices  $\alpha$  están conectadas mediante asas (loops).

El sitio activo está siempre en el extremo carboxilo terminal de las hebras beta (Wierenga et al., 1992). Los residuos involucrados en la catálisis están localizados en dos asas distintas: asa 4 (His 95) y el asa 6 (Glu 167) (figura 2). El asa 1 contiene la Lys 13, un aminoácido que no participa directamente en la catálisis, pero ayuda en el posicionamiento de la His 95 al formar un puente salino con el Glu 97.

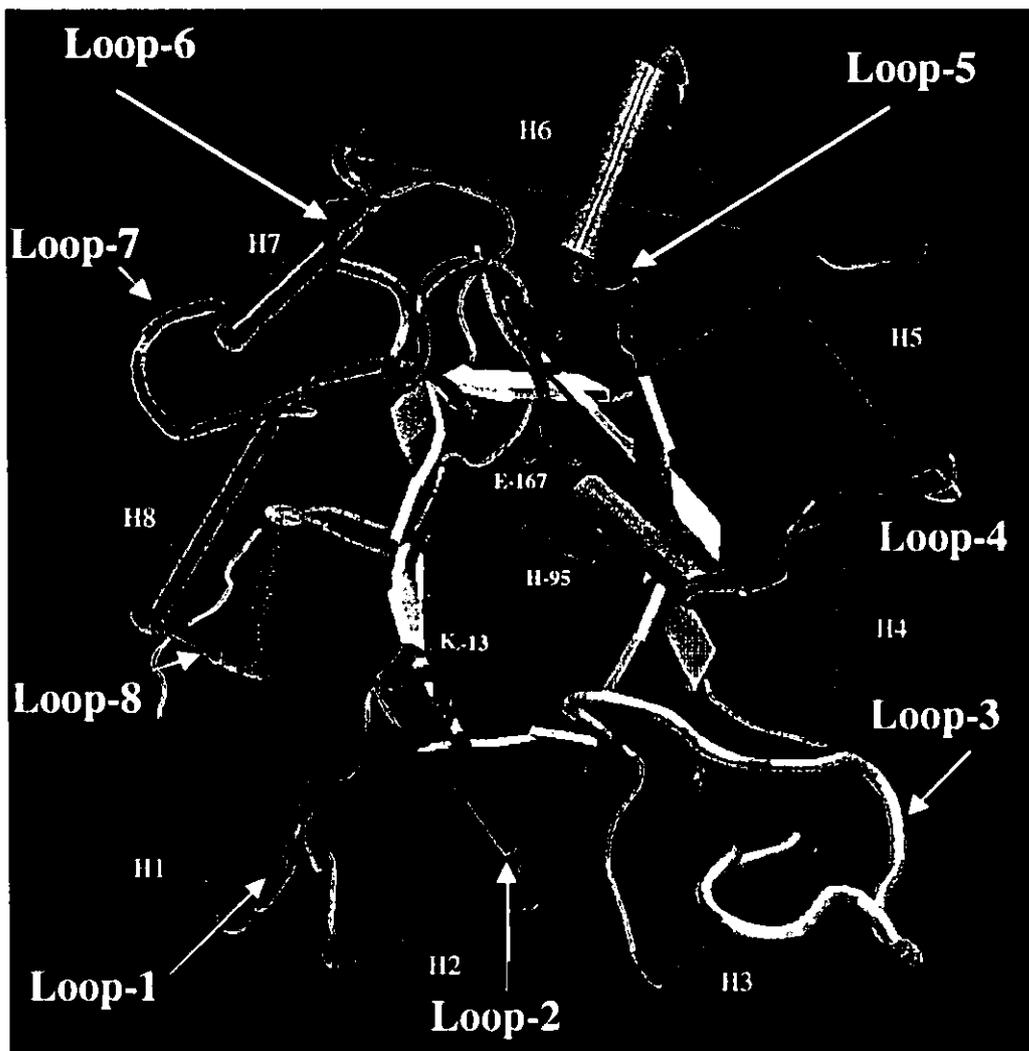


Figura 2. Una subunidad del dímero de la triosafosfato isomerasa de *T. brucei* en donde se representa el dominio estructural ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, el asa 3 (importante en la dimerización) y los aminoácidos del sitio activo.

Las asas 1, 2, 3 y 4 son los responsables de la formación de la interfase dimérica. Entre las asas 1 y 4 de la misma subunidad se encuentra una profunda cavidad cercana al sitio activo. Esta cavidad es rellena por el asa 3 de la otra subunidad o monómero. Dos de las asas sobresalen hacia afuera después de las hebras beta de cada subunidad: asa 3 y el asa 6. El asa 3 de la subunidad 2 embona o rellena la profunda cavidad entre las asas 1 y 4 de la otra subunidad; manteniendo interacciones con los residuos Lys 13 y Glu 97 vía contactos Van der Waals y puentes de hidrógeno entre los aminoácidos Thr 75 de la punta del asa 3 y el ácido carboxílico del Glu 97.

La cavidad del sitio activo es muy cercana a la interfase dimérica y al embonamiento del asa 3 de la otra subunidad. Sin embargo, los residuos que interactúan directamente con análogos del sustrato son todos de la misma subunidad, esto forma dos subunidades cada una con su sitio activo independiente para catálisis. El asa 3 tiene el papel de empujar y posicionar las asas de la otra subunidad hacia adentro, mientras que el resto de la otra subunidad cumple el papel de una especie de techo que tapa parte del otro monómero para evitar la entrada del agua y de esta forma ayudar en la reacción. El segundo gran asa, el asa 6, sobresale hacia el solvente cuando no hay sustrato ligado (forma abierta) y se cierra cuando el sitio activo une su sustrato (forma cerrada). Dicha asa funciona como una tapa que se cierra o abre dependiendo de la presencia o ausencia del sustrato (Joseph et al., 1990).

## 2.2 El mecanismo de reacción

El mecanismo de reacción de la TIM ha sido estudiado en detalle por Knowles (1991). Después de la unión del sustrato, se lleva a cabo la conversión de DHAP a GAP. La cadena lateral desprotonada del glutámico catalítico (Glu 167 en TIM de *Trypanosoma brucei*), quita un protón del C-9 (equivalente al N-9 en el inhibidor fosfoglicolato hidroxamato (PGH)), con lo cual se genera un intermediario enediolato con los átomos C-7, O-8, C-9 y O-10 en un plano (como en PGH). La cadena lateral de la histidina 95 facilita la transferencia del protón entre el O-8 y O-10. La cadena lateral del glutámico protonado libera el protón al C-7, con lo cual se completa el segundo paso de transferencia del protón (Schliebs et al., 1996) (figura 3).

En el complejo enzima-PGH, la cadena lateral del Glu 167 está bien posicionada (sobre el plano), para la transferencia del protón entre los dos átomos de carbono y el N2 de la cadena lateral de la His 95 puede facilitar la transferencia del protón entre los átomos O-8 y O-10. Los átomos cargados positivamente N (lys13) y N (Asn11) bajo el plano del enediolato, facilitan la transferencia del protón por el glutámico catalítico.

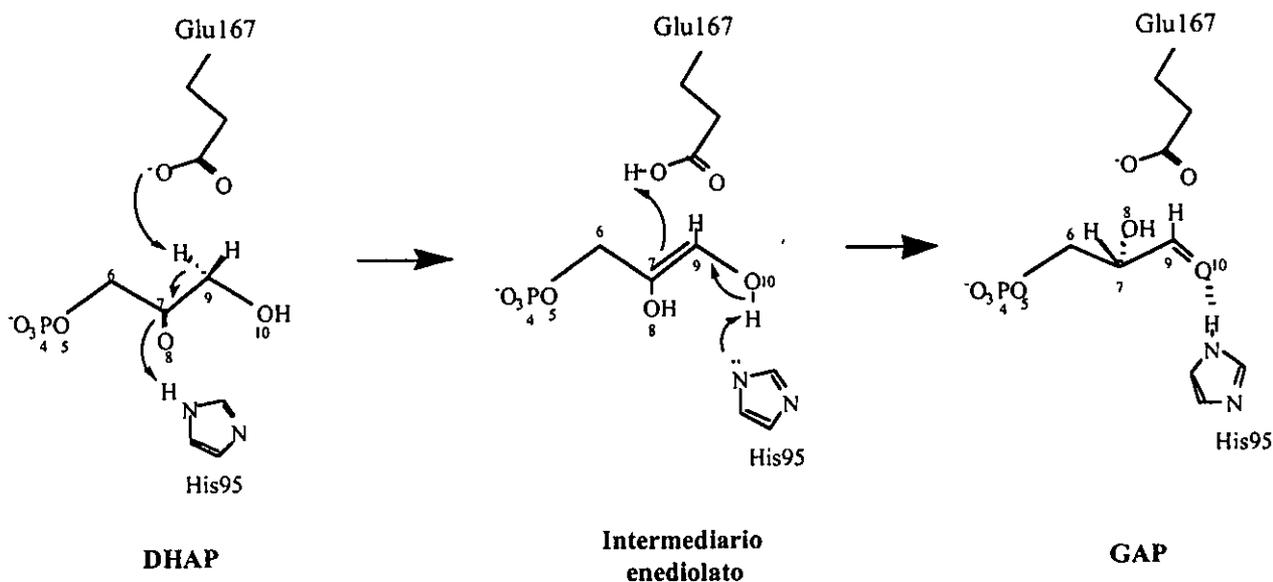


Figura 3. Mecanismo catalítico de la isomerización de los azúcares DHAP a GAP llevado por la triosafosfato isomerasa.

Knowles y Albery en 1977 han demostrado que la TIM, ha alcanzado la perfección catalítica porque la velocidad de la reacción bimolecular entre la enzima y el sustrato está controlada por la difusión, es decir que la formación del producto tiene lugar con la misma rapidez con la que la enzima y sustrato chocan en solución, de forma que cualquier intento de aumentar la eficiencia catalítica de TIM dimérica no produce ningún aumento en la velocidad de la reacción.

### 2.3 La familia de los barriles ( $\alpha/\beta$ ).

La familia de los barriles  $\alpha/\beta$  se encuentra caracterizada por la formación de un dominio estructural  $\alpha/\beta$  formado por un corazón central de hebras  $\beta$  paralelas cubiertas en su exterior por  $\alpha$ -hélices; las hebras  $\beta$  y las hélices  $\alpha$  están conectadas mediante asas.

Es interesante señalar que en todas las enzimas de la familia de barriles  $\alpha/\beta$ , el sitio activo está localizado hacia el extremo carboxilo terminal de las hebras beta, a pesar de que las reacciones catalizadas por estas enzimas son ampliamente diferentes. Al parecer, el plegamiento de barril  $\alpha/\beta$  ha sido exitoso a lo largo de la evolución al ser empleado como un "scaffold" o esqueleto estable sobre el cual se han montado diferentes sitios activos. A pesar del gran parecido estructural, la baja

identidad en la secuencia primaria no ha permitido concluir si los barriles  $\alpha/\beta$ , han sido derivados de un ancestro común por evolución divergente (Farber, 1993; Reardon y Farber, 1995) o realmente ellos convergieron hacia la formación de un mismo tipo de plegamiento  $\alpha/\beta$  (Doolittle, 1994). Aproximadamente el 10% de las estructuras de enzimas conocidas en la actualidad, presentan un dominio estructural del tipo barril ( $\alpha / \beta$ )<sub>8</sub>.

Como ya se mencionó, los miembros de esta gran familia de proteínas catalizan diferentes tipos de reacciones, por tal motivo han sido blanco de una gran cantidad de estudios de ingeniería genética y estructura de proteínas (Bertolaet y Knowles, 1995; Brange et al., 1998; Deirdre y Farber 1995; Farber y Petsko 1990; Keeling y Doolittle, 1997; Kirschner y Eder 1992; Kishan et al., 1994; Lodi et al., 1994; Luger et al., 1989; Luger et al., 1990; Mainfroid et al., 1993 y Wilmanns et al., 1992). El modo de acción de este tipo de proteínas varía desde multímeros oligoméricos hasta monómeros. Sin embargo, es deseable poder contar con formas monoméricas de barriles de TIM que permitan la simplificación y el entendimiento del análisis estructural y funcional de estas proteínas.

En esta clasificación de barriles  $\alpha/\beta$  se encuentra la TIM; esta enzima al parecer se encuentra en todos los organismos hasta ahora reportados y actúa como dímero. La única excepción está presente en las bacterias termófilas, en donde se han encontrado TIM tetraméricas, como es el caso de *Thermotoga maritima* (Schuring et al., 1995). El análisis estructural de la TIM permitió el diseño de una variante monomérica a partir de la enzima silvestre de *Trypanosoma brucei* (wt TIM), por el acortamiento del asa 3 (loop importante en la dimerización del barril), la cual es conocida como monoTIM (Borchert et al., 1993; Borchert et al., 1994).

#### **2.4 La monoTIM y sus propiedades.**

La monoTIM fue construida a través de un proyecto de ingeniería de proteínas con el objetivo de estudiar el papel de la dimerización en la actividad de esta familia de enzimas, formando enzimas monoméricas con sitios activos independientes. Esta enzima fue generada mediante el reemplazamiento de 15 residuos que forman la interfase de dimerización por 8 residuos diferentes. Las mutaciones afectan parte del asa 3 y la alfa-hélice 3 del dímero de TIM de *Trypanosoma brucei*. El esquema de numeración y la secuencia de wt TIM y monoTIM son mostrados en la figura 4.

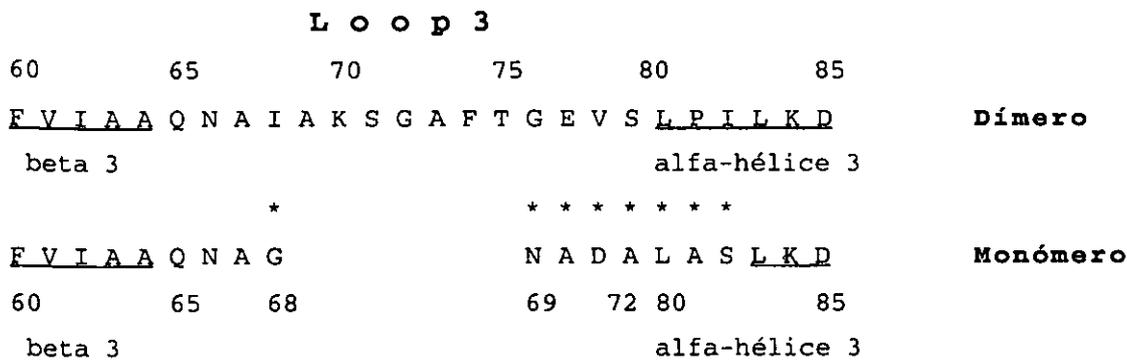


Figura 4. La secuencia de aminoácidos de la beta 3 y la alfa-hélice 3 se muestran subrayadas. El fragmento de 15 residuos incluye las posiciones 68 a 79 (en el asa 3) y 80 a 82 (en la alfa-hélice 3) de la enzima dimérica. Dicho fragmento es remplazado por 8 residuos que forman un nuevo asa 3 más corto en el monómero; las mutaciones son marcadas por asteriscos.

La monoTIM es una proteína estable que muestra una actividad catalítica significativamente menor a la de la enzima dimérica. Su *k<sub>cat</sub>* es 1000 veces más pequeña que la encontrada para la enzima wt TIM, mientras que la *K<sub>m</sub>* es 20 veces más grande con respecto a la que presenta la enzima silvestre. El análisis de la estructura cristalográfica de la monoTIM reveló que las asas 1 y 4 muestran considerables diferencias en sus propiedades estructurales con respecto a la wt TIM (figura 5). El asa 1, en el que se encuentra la Lys 13, está completamente móvil, por lo que no aparece en la estructura cristalográfica y el asa 4 (con la His 95) adopta una conformación diferente (Borchert et al., 1993).

Se sabe que la TIM presenta dos residuos catalíticos: His 95 y Glu 167, los cuales son esenciales para la catálisis de monoTIM, aunque la Lys 13 no participa directamente en la catálisis, se sabe que una mutante que carece de estos residuos es completamente inactiva (Schliebs et al., 1996). Se conocen dos inhibidores competitivos de TIM: el fosfoglicolato hidroxamato (PGH) y el 2-fosfoglicolato (2PG). La afinidad por el sitio activo de la monoTIM por estos inhibidores se encuentra también afectada. El análisis cristalográfico de la proteína monomérica en presencia de estos inhibidores mostró que el 2PG interactúa con la Lys 13 y la His 95 de un modo muy similar, pero no idéntico al observado en la enzima silvestre.

Este resultado sugiere que a pesar de la ausencia de la otra subunidad, la monoTIM cataliza la interconversión de dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehído-3-fosfato por el mismo mecanismo que el dímero (Borchert et al., 1993).

Hay una diferencia en la energía de activación en la enzima que ahora es monomerizada debido a que la His 95 y el asa 1 se encuentran en conformaciones diferentes a las requeridas para la catálisis como se encuentran en la enzima dimérica. La energía que ahora se tiene que emplear o invertir en monoTIM para mantener a estos residuos en el sitio catalítico, dan lugar a un aumento en la energía de activación para la reacción y por tanto una disminución en la *k<sub>cat</sub>*.

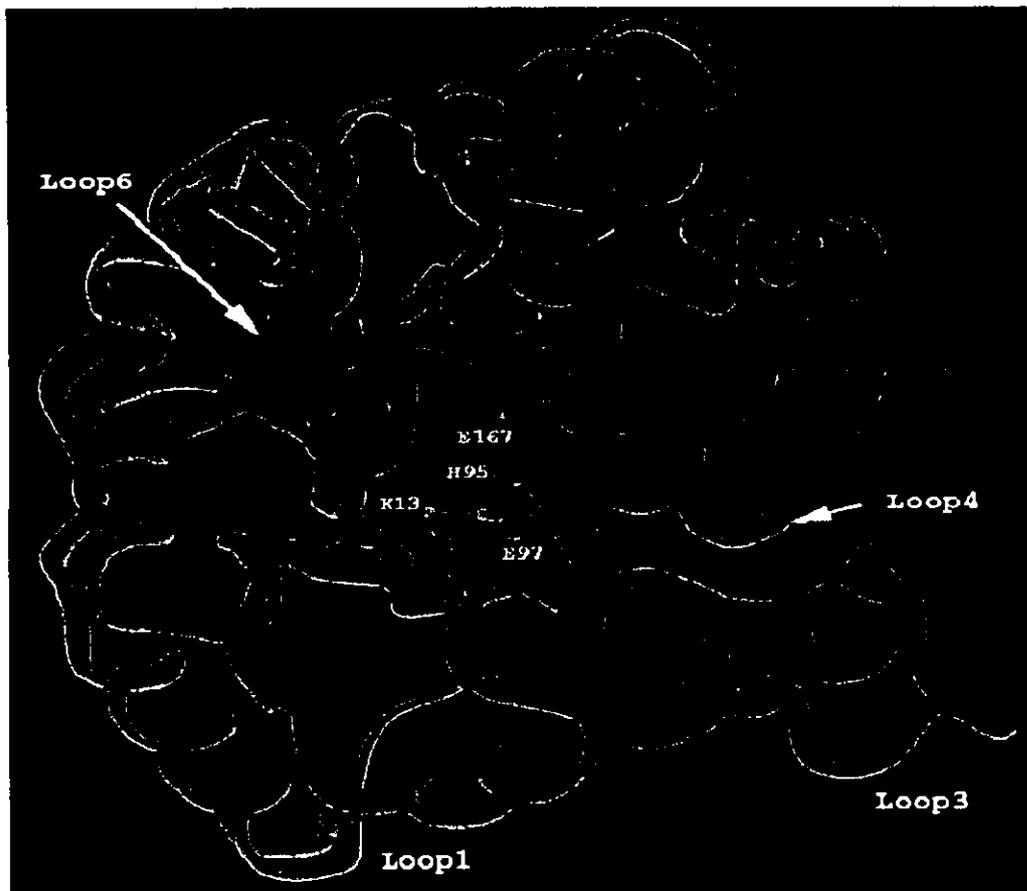


Figura 5. Sobreapamiento de las estructuras de monoTIM (rojo) y de una de las subunidades de la enzima dimérica (verde), en donde se representa el dominio estructural ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>. Las cadenas laterales de los residuos en el sitio activo están indicadas.

## 2.5 Evolución dirigida en las proteínas.

La evolución dirigida consiste en la modificación de genes con la finalidad de formar proteínas modificadas que bajo esquemas adecuados de selección, permitan mejorar alguna (s) de

sus propiedades (actividad, estabilidad, etc.). Mediante técnicas como la PCR mutagénica al azar (Cadwell y Joyce, 1992), recombinación sexual (Stemmer, 1994), StEP (Zhao et al, 1998), entre otras.

Mediante la evolución dirigida ha sido posible la generación de proteínas con propiedades diferentes, por ejemplo: la formación de proteínas más activas a partir de la cual fueron formadas (Cramer et al, 1996; Taguchi et al, 1998; Zacco y Gherardi, 1999), proteínas con tolerancia a la temperatura (Akanuma et al, 1998; Meijer et al, 1996; Satoh et al, 1999 y Zhao y Arnold, 1999), etc.

Existen una gran cantidad de trabajos sobre la evolución dirigida de las proteínas, en donde se diseña el método de selección para la propiedad que se pretende mejorar basado en una cepa deficiente en la actividad indispensable que se desea evolucionar, para complementar la actividad con los mutantes generados (Buchholz et al, 1998; Matsuura et al, 1999; Matsumura y Ellinton, 1996; Kumamaru et al, 1998; Kosa y Sweasy, 1999; Vartanian et al, 1996 y Williams et al, 1999). Las técnicas mediante la cuales opera la evolución dirigida radican en incorporar mutaciones a lo largo del gene o en una región particular para la generación de variantes independientes que puedan ser seleccionadas y analizadas de acuerdo a los fines que se persigan. Es importante mencionar que se puede controlar la tasa de mutación, lo cual es relevante ya que una tasa elevada de mutación puede provocar una rápida pérdida de la función de la proteína y en algunos otros casos hasta la pérdida de la estructura primaria original. Sin embargo, si se desea aumentar la actividad de una función enzimática ya existente, es relevante tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

- 1) Tasas de mutación bajas que nos permitan tener pocas mutaciones por gene.
- 2) Bancos génicos de variabilidad grandes que nos permiten tener representadas la mayor cantidad de mutaciones (sencillas, dobles, triples y hasta cuádruples mutantes) a nivel de nucleótidos.
- 3) Contar con un método de selección que permita discriminar las variantes más activas de las menos activas.
- 4) La adición de la PCR sexual o gene shuffling a los parámetros anteriores ayuda a mejorar más la actividad de las mutantes ganadoras. El PCR sexual se basa en la recombinación homóloga de una serie de fragmentos al azar de genes mutados unidos por la PCR (Stemmer, 1994).

Nosotros elegimos a la TIM de *Trypanosoma brucei* debido a que ya se cuenta con la enzima monomerizada y con una estructura cristalina refinada a 1.83 Å de resolución. Se cuenta con la estructura cristalográfica tanto de la enzima dimerica (Wierenga et al., 1991), como de la monomérica (Borchert et al., 1994), en ausencia y en presencia de diferentes inhibidores competitivos (Lolis y Petsko, 1990; Davenport et al., 1991 y Noble et al., 1993).

Ya que se observó que ni la estructura, ni el modo de interacción con el inhibidor se afectaron seriamente al monomerizar a la TIM, resulta muy atractivo tratar de regenerar su actividad, debido a que los residuos catalíticos están presentes en el monómero sólo que se encuentran desplazados de sus contactos originales en comparación al dímero. Nosotros proponemos abordar este problema haciendo evolución dirigida por mutagénesis al azar del gene de monoTIM, con la finalidad de incorporar variaciones de dicho gene que permitan la introducción de mutaciones benéficas en la actividad.

Un requisito importante para llevar a cabo este proyecto es el contar con una cepa que nos permita seleccionar variantes más activas. Aunque existen algunas cepas de *E. coli tpi-* reportadas como la AA200 (Anderson y Cooper, 1970) y DF502 (Babul, 1978), estas cepas presentan problemas de altos índices de reversión o baja eficiencia de electrotransformación respectivamente. Por lo que un factor determinante para el éxito de este trabajo fue la obtención de una cepa *tpi-* con las características deseadas (baja reversión y alta eficiencia de electrotransformación).

### III. OBJETIVOS

- **Objetivo general**

1.- Regeneración enzimática de una variante monomérica de la enzima triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* mediante mutagénesis al azar.

- **Objetivos particulares**

1.- Crear una cepa de *E. coli* para selección de la función de triosafosfato isomerasa, mediante el “knockout ” del gene cromosomal.

2.- Validación de las propiedades de complementación de la cepa creada *tpi* -, ante variantes del gene *tpi* de diferente actividad.

3.- Estudiar sistemáticamente distintas condiciones de crecimiento de la cepa complementada para establecer el rango dinámico de selección de actividad.

4.- Generar mutantes en el gene de la mono TIM con el empleo de mutagénesis al azar.

5.- Selección de mutantes más activas que mono TIM y su caracterización.

#### **IV. HIPOTESIS**

La evolución dirigida ha mostrado ser una herramienta poderosa para el mejoramiento de la actividad enzimática en otro tipo de proteínas que no son TIM. Resulta muy interesante emplear esta estrategia para poder evolucionar hacia una mayor actividad la proteína monoTIM. Nosotros proponemos que la incorporación de mutaciones cercanas al sitio activo, pueden favorecer el posicionamiento adecuado de los residuos catalíticos y/o estabilizar a la proteína en otras regiones estructurales. Este mejoramiento se debe ver reflejado en una mayor actividad.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados en las diversas metodologías utilizadas durante la elaboración de este trabajo se mencionan a continuación.

- Medio Luria - Bertani (importante para el crecimiento de *E. coli* ).

	1 Litro
Tryptona	10gr
Extracto de levadura	5gr
NaCl	10gr
Bacto Agar	5gr

- Ajustar a pH 7, en los medios líquidos no se agrega agar

- Medio SOC (empleado para la recuperación de las células electrotransformantes de *E. coli* ).

	500 ml
Tryptona	10gr
Extracto de levadura	2.5gr
NaCl (1M)	5 ml
KCl (1M)	1.25ml
Glucosa (2M)	50µl
MgSO <sub>4</sub> (1M)	50µl

- Ajustar a pH 7

- Medio M9 (empleado para la selección de las células electrotransformantes de *E. coli* ).

Sales M9 10X	500 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15gr
NaCl	2.5gr
NH <sub>4</sub> Cl	5gr

- Las siguientes soluciones se agregan después de esterilizar.

	250ml
Sales M9 10X	25ml
Glucosa 20%	2.5ml
MgSO <sub>4</sub> 1M	250μl
Vitamina B1	250μl
CaCl <sub>2</sub> 1M	25μl
Casaminoácidos 20%	468μl
Amp (200μg/ml)	250μl
Km (25μg/ml)	250μl
IPTG	100μl

## 5.2 Enzimas empleadas.

Todas las enzimas de restricción empleadas durante la elaboración de este trabajo provienen de la empresa Boehringer, así como la fosfatasa alcalina y ligasa, únicamente la Taq polimerasa es obtenida de una cepa que la produce y es purificada en el laboratorio por FPLC (FiliTaq).

enzima	concentración	secuencia que reconoce
BamHI	10 U/μl	5' G-GATCC 3'
HindIII	10 U/μl	5' A-AGCTT 3'
EcoRI	10 U/μl	5' G-AATTC 3'
MluI	10 U/μl	5' A-CGCGT 3'
AvaII	5 U/μl	5' G-GACC 3'
PstI	10 U/μl	5' CTGCA-G 3'
Fosfatasa Alcalina	1 U/μl	5' P DNA ---- 5'OH DNA
T4 DNA Ligasa	1 U/μl	cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos vecinos 3'OH y 5' fosfato en DNA de doble cadena
Taq	5 U/μl	actividad 5' a 3'

**Tabla 1.** Se muestran las enzimas empleadas, la concentración a la cual se encuentran y la secuencia sobre la cual actúan en el DNA.

### 5.3 Cepas para selección.

En la actualidad, se han generado cepas mutantes en el gene de la triosafosfato isomerasa (*tpi* -) de *E. coli* como la cepa AA200 generada por mutagénesis química (Anderson y Cooper, 1970) y DF502 (Babul, 1978). Uno de los objetivos primarios de este trabajo es la formación de bancos grandes de millones de variantes para un gene dado, por lo que se requiere de cepas con una alta eficiencia de electrotransformación; debido a esto la cepa DF502 no nos fue útil, ya que presenta una baja eficiencia de transformación.

En cuanto a la cepa AA200 se ha observado que tanto la TIM dimérica como la monomérica del parásito son capaces de complementar la función de la TIM endógena de *E. coli*. Sin embargo, la experiencia encontrada en el laboratorio nos reveló la presencia de un alto grado de reversión de la cepa dando un alto índice de falsos positivos.

Con la finalidad de seleccionar mutantes mas activas que monoTIM, nos dimos a la tarea de generar una cepa nueva de *E. coli* que nos permitiera diferenciar entre la actividad de la enzima dimérica y la monomérica del *Trypanosoma brucei* (parásito). Para evitar que la enzima endógena de *E. coli* interfiriera con el análisis de las TIM del parásito, era necesario inactivar el gene cromosomal de *tpi*. Para lo cual fue necesario realizar el “knockout” y la validación de las propiedades de complementación de dicha cepa en medios selectivos.

### 5.4 Obtención de la secuencia genómica de *Escherichia coli* para el Knockout del gene *tpi* del cromosoma bacteriano.

La secuencia del gene *tpi* de *E. coli* se obtuvo de la base de datos de *E. coli* de la cepa K12 (cepa secuenciada completamente por Blattner et al., 1997). Se tomaron 4.3 Kb de secuencia genómica, en donde se situó en el centro el gene *tpi* de 768pb que codifica para la enzima triosafosfato isomerasa de *E. coli* (256 aa). Se diseñaron dos oligonucleótidos que introdujeron en la secuencia nucleotídica los sitios de restricción para las endonucleasas HindIII para un oligo y BamHI para el otro (estas secuencias se muestran en la figura 6); esto facilitó la clonación posterior del fragmento en el vector pUC18. Se puso especial atención para el diseño de las secuencias de los oligonucleótidos, en que no cayeran en genes o en secuencias regulatorias que pudieran alterar otras regiones génicas.

Para la amplificación del producto genómico se probaron diferentes temperaturas de alineamiento para establecer la temperatura óptima que permitiera amplificar el producto esperado. Utilizando el siguiente programa:

95 °C (desnaturalización)	gradiente 50 a 56 °C (alineamiento)	72°C (extensión)	# de ciclos
1 min	1 min	2 min	25
0	0	10 min	1

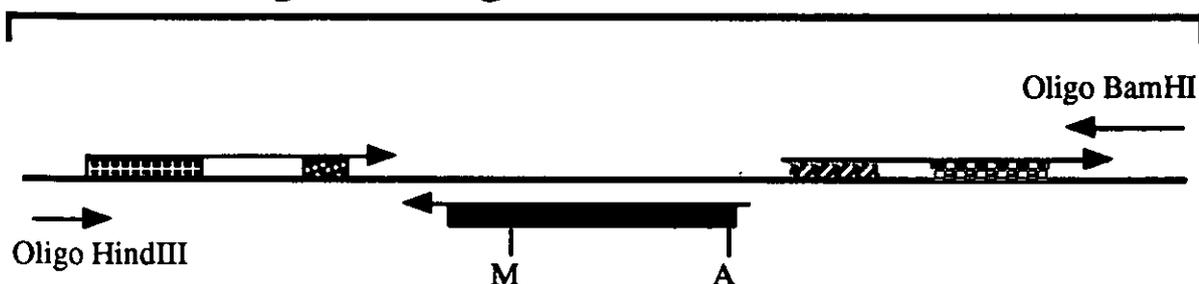
Utilizando los oligos HindIII y BamHI, se extendió un producto de 4.3 Kb mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (figura 6). El gene de 768pb que codifica para la TIM se encuentra ubicado en el centro de este fragmento.

En el análisis de sitios de restricción de la secuencia del producto de PCR se buscaron sitios únicos que pudieran ser utilizados para la inserción de un cassette que interrumpiera la secuencia del gene *tpi*. Se identificó como sitio único de clonación presente en el gene *tpi* al sitio MluI. Dicho sitio se encuentra localizado casi al final del gene, por lo que la inserción del cassette interrumpe el gene y con ello la proteína a nivel de los últimos 41 aminoácidos (aa), los cuales son importantes en el mantenimiento de la estructura del barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>. Como resultado de esta inserción, es posible la obtención de una proteína truncada que muy probablemente será inactiva debido a la pérdida del sitio de ligadura al fosfato presente en todas las TIM (Wilmanns et al, 1992 y Bork et al, 1995), sitio de vital importancia para que la TIM pueda unir su sustrato, suponiendo que el producto proteico aún fuera capaz de plegarse.

Una de las técnicas más empleadas en la actualidad para la interrupción de genes en el genoma de *E. coli* se basa en esquemas de doble recombinación, haciendo uso de plásmidos sensibles a temperatura que permiten la selección de dobles recombinantes. Al elevarse la temperatura de un cultivo bacteriano, los plásmidos no son capaces de replicarse y son eliminados en las siguientes divisiones celulares (Hamilton et al, 1989).

Lo relevante del sistema, es el hecho de que a través de un fenómeno de doble recombinación, el gene silvestre de *E. coli* es sustituido por una versión inactiva del mismo, incluyendo además un marcador que permite su posterior selección. La ventaja de hacer cepas cuyos genes han sido eliminados de esta manera radica en que la posibilidad de reversión es prácticamente nula y los genes son selectivamente eliminados, a diferencia de las cepas formadas por esquemas de mutágenos químicos, que son muy inespecíficos y tienen altos grados de reversión, como pudimos observar en la cepa AA200.

## Fragmento genómico de 4.3Kb



Oligo HindIII    5' AACCTTCTGGCAAGCTTTGCTCATC 3'

Oligo BamHI    5' CTGCAGAGGATCCAGCGGGCGGCAAG 3'

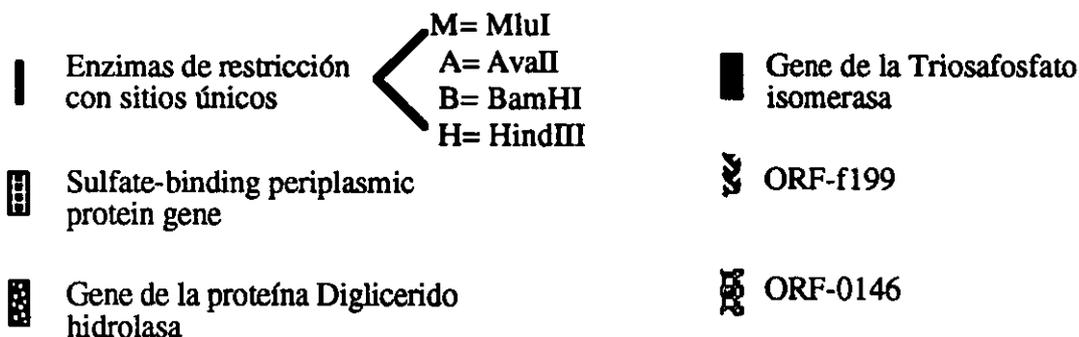


Figura 6. Ubicación del gene *tpi* de *E. coli* junto con las regiones génicas que lo flanquean. Se muestran los sitios de restricción que son únicos, los nucleótidos en letras negras marcan los sitios de restricción para las endonucleasas empleadas.

Para llegar a la obtención del plásmido pRMAK109 sensible a temperatura, fue necesaria la construcción de los plásmidos pRUC7 y pRUC81. El pRMAK109 tiene clonado el fragmento genómico de *E. coli* (4.3 Kb). En dicho fragmento se encuentra interrumpida la secuencia de TIM por medio del cassette que contiene la unidad transcripcional que expresa la proteína Neomicina fosfotransferasa (NPTII). Esta proteína es la responsable de inactivar a la kanamicina (Km).

Una vez formado, el plásmido pRMAK109 nos permitió el “knockout” del gene cromosomal de *E. coli* mediante un evento de doble recombinación.

### **5.5 Construcción de los diferentes plásmidos para la formación del plásmido pRMAK109.**

1) Plásmido pRUC7 (pUC18+producto genómico de PCR de 4.3Kb).

El plásmido pRUC7 de 7 Kb se construyó a partir de la clonación del producto de PCR de 4.3Kb en pUC18 (figura 7). El plásmido pUC18 fue empleado para clonar el producto de PCR por dos razones: contiene un “polylinker” en el cual se encuentran como sitios únicos BamHI y HindIII y no presenta ningún sitio MluI, de manera que el único sitio de MluI es el que esta presente en el gene *tpi* de *E. coli*.

Se digirieron 200 ng del producto de PCR del genoma de *E. coli* y 100 ng del vector pUC18 con las enzimas BamHI y HindIII (con los buffers de Boehringer) a 37°C durante toda la noche, corriendo controles individuales de digestión. Una vez que se verificó que la digestión fuera completa, se procedió a desfosforilar el vector mediante la adición de 1 µl de fosfatasa alcalina, durante 1 hora a 37°C, después de lo cual, se inactivó la enzima 10 min a 75°C en presencia de EDTA 5mM. Los fragmentos así obtenidos se purificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, las bandas fueron visualizadas bajo luz ultravioleta (UV) después de la adición de Bromuro de etidio y cortadas. Los fragmentos de DNA fueron purificados de la agarosa utilizando el Kit de Qiagen con el protocolo ahí propuesto. Una vez purificados los fragmentos de DNA se verificó su concentración aproximada mediante un gel de agarosa al 1%. Se pusieron a ligar aproximadamente 50 ng de vector con 600 ng de inserto en un volumen final de 20µl con ligasa y buffer de ligasa de Boehringer. La ligación se incubó a 16°C durante toda la noche. Posteriormente, el DNA fue precipitado con butanol. La pastilla de DNA se secó mediante Savant por 10 min y se resuspendió en 5 µl de agua, de los cuales 2µl se utilizaron para electroporar 50µl de células JM101 electrocompetentes, preparadas de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook et al., (1989), mediante 1 pulso de 0.8 Kilovolts (KV). Después del pulso, las células se recuperaron en 1 ml de medio SOC e incubaron a 37°C durante 1 hora antes de platearlas en las cajas de medio Luria Bertani (LB) y Ampicilina (Amp) 200µg/ml a 37 °C. Como control se empleó un plásmido ligado sin inserto, bajo las mismas condiciones. Después de la incubación a 37°C toda la noche, se obtuvieron cientos de colonias de la transformación con inserto, comparada con 3 a 5 colonias del

vector ligado sin inserto. Se tomaron al azar 4 colonias de la caja de ligación con inserto y se utilizaron para inocular tubos con 6 ml de medio LB+Amp 200µg/ml; las clonas se incubaron toda la noche a 37 °C. Una vez crecidos los cultivos, se purificó el plásmido pRUC7 usando el Kit de Boehringer (High Pure™ Plasmid Isolation Kit) con el protocolo ahí propuesto. Se digirieron los plásmidos con la enzima MluI y su Buffer de Boehringer, para comprobar la presencia del inserto.

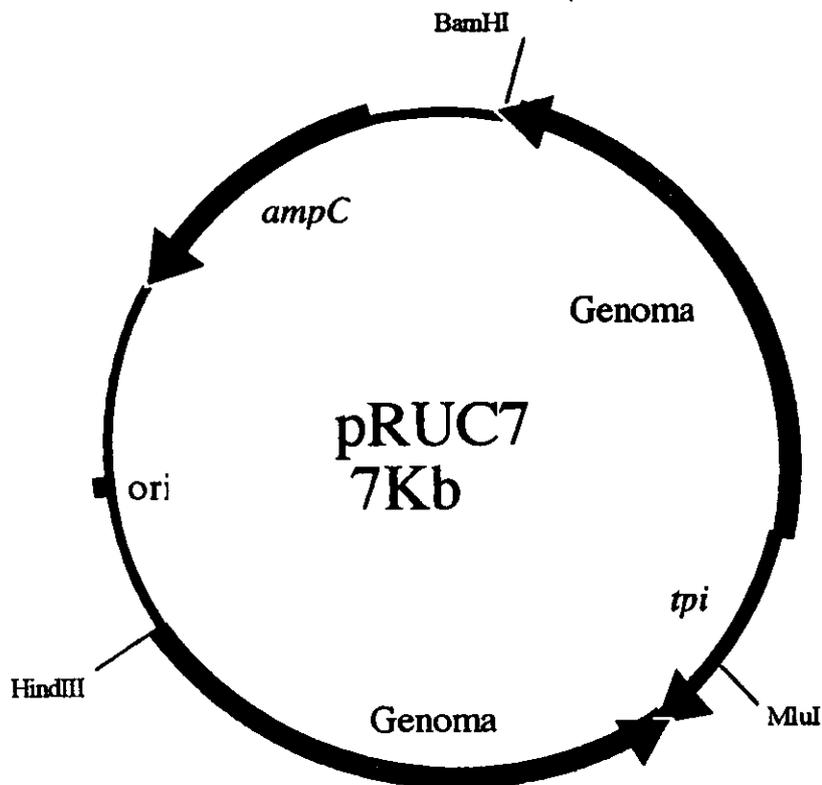


Figura 7. El plásmido pRUC7 de 7Kb contiene el origen de replicación, el gene de resistencia a ampicilina y el producto genómico en donde fue situado el gene *tpi* de *E. coli* en el centro.

2) Plásmido pRUC81 (pUC18 + producto de 4.3Kb + la unidad de transcripción de NPTII de 1.1 Kb).

El plásmido pRUC81 de 8.1 Kb se construyó interrumpiendo el gene *tpi* del plásmido pRUC7 por la unidad de transcripción de la Neomicina fosfotransferasa NPTII (figura 8). Dicha unidad transcripcional está flanqueada por dos sitios MluI en el plásmido pBSL98, del que fue obtenida para su clonación en el plásmido pRUC7 dando lugar al plásmido pRUC81.

El plásmido pBSL98 se transformó en la cepa JM101 por electroporación con un pulso de 0.8 KV, las colonias transformantes se incubaron a 37°C en cajas con medio LB y Km 25µg/ml durante toda la noche. Se inocularon 6 ml de medio LB+Km 25µg/ml con una de las colonias seleccionadas en caja y se incubó a 37°C durante 12 hrs. De este cultivo se purificó suficiente plásmido pBSL98 utilizando el Kit de Boehringer (High Pure™ Plasmid Isolation Kit). Se pusieron a digerir 200 ng de este plásmido con MluI durante toda la noche a 37°C; al mismo tiempo que se digirió el plásmido pRUC7 obtenido anteriormente con esta misma enzima.

De la digestión del pBSL98, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% se separó el fragmento de 1.1Kb liberado y posteriormente el fragmento se purificó de la agarosa utilizando el Kit de Qiagen para dicho propósito. Por otro lado el vector pRUC7 digerido con MluI, fue desfosforilado mediante el tratamiento con 1µl de fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C, después de lo cual, la enzima fue inactivada a 75°C durante 10 min en presencia de EDTA 0.5mM. Se llevó a cabo una extracción con un volumen igual de una mezcla de fenol cloroformo (1:1), para remover la enzima, la fase acuosa se precipitó con butanol y se lavó con etanol al 70%, se secó la pastilla en el Savant para luego resuspenderla en un volumen de 20 µl de agua destilada. Después de verificar la concentración aproximada del vector pRUC7 digerido y del fragmento de 1.1 Kb liberado del pBSL98 (el cual contiene la unidad de transcripción de la Neomicina fosfotransferasa). Se ligaron 50 ng de vector con 200 ng de inserto empleando la ligasa y el buffer de Boehringer, en un volumen final de 20 µl durante toda la noche a 16°C. El procedimiento de electroporación se repitió como en el caso anterior con un pulso de 0.8 KV y la electroporación se plateó en cajas de LB+Amp(200µg/ml)+Km (25µg/ml). Se seleccionaron colonias al azar y se purificó el plásmido pRUC81 utilizando el Kit de Boehringer y se digirió con la enzima MluI para comprobar la presencia del inserto.

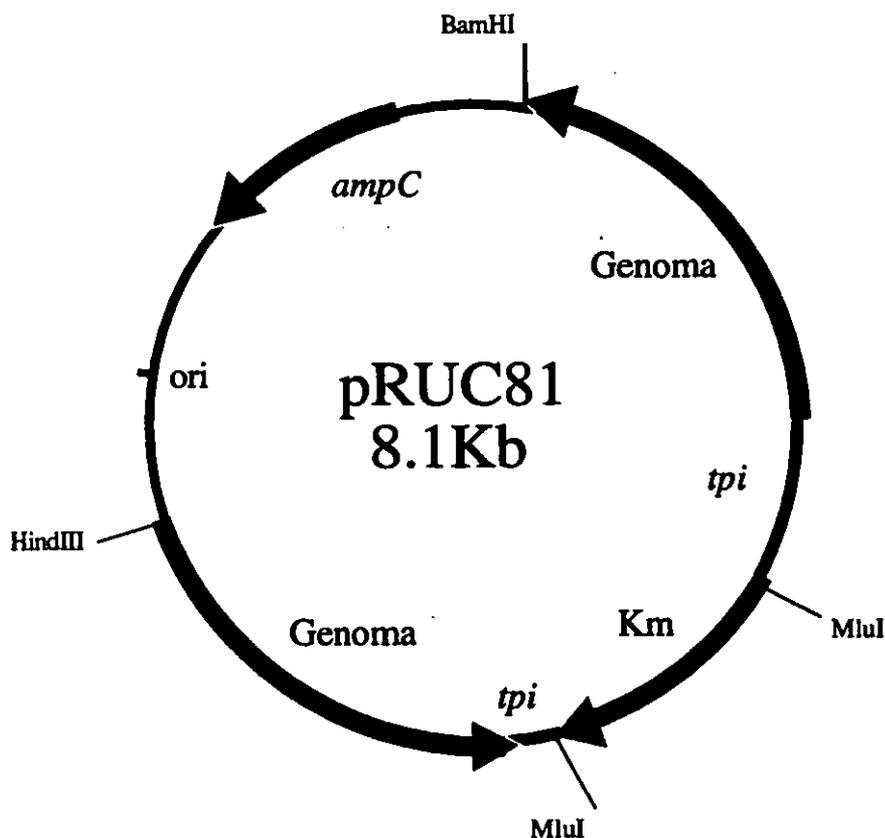


Figura 8. El plásmido pRUC81 de 8.1Kb contiene el origen de replicación, el gene de resistencia a ampicilina y la inserción del interosón en el gene *tpi*.

3) Plásmido pRMAK109 (producto de 4.3Kb + interosón de NPTII + pMAK705).

El plásmido pRMAK109 de 10.9 Kb es el resultado de la subclonación del fragmento de 5.4 Kb del plásmido pRUC81 en pMAK705 (figura 9). El plásmido termosensible pMAK705 de 5.5 Kb se transformó por electroporación en la cepa JM101. Las células transformantes fueron crecidas a 30°C en cajas con medio Luria y cloramfenicol (Cm) 20µg/ml, debido a que el pMAK705 tiene clonado el gene que codifica para la proteína cloramfenicol acetil transferasa, responsable de la inactivación del cloramfenicol. De una de las colonias resultantes, se purificó suficiente plásmido pMAK705 utilizando el Kit de Boehringer. 300 ng de plásmido pMAK705 fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y HindIII utilizando el buffer en común, durante 15 hrs a 37 °C. Después de este período y de verificar individualmente la eficiencia de cada una de la digestiones, se desfosforiló el vector mediante la adición de 1µl de fosfatasa alcalina

durante 1 hora a 37°C. La inactivación de la fosfatasa se llevó a cabo mediante la incubación por 10 min a 75°C en presencia de EDTA 5mM. El fragmento de 5.5 Kb se purificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% como se describió anteriormente.

Por otro lado 200 ng del vector pRUC81 se digirieron igualmente con las enzimas BamHI y HindIII. Después de 15 hrs de digestión a 37°C, los productos de digestión fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, la banda de 4.3 Kb se cortó del gel y el fragmento se purificó de la agarosa, utilizando el Kit de Qiagen para la purificación de fragmentos de geles de agarosa.

Se checó la concentración aproximada de cada uno de los fragmentos purificados (5.5Kb de pMAK705 y 5.4Kb del pRUC81) y se pusieron a ligar 50 ng de pMAK705 con 300ng de fragmento de 5.4Kb del pRUC81 con la ligasa de Boehringer, en un volumen final de 20 µl durante toda la noche a 16°C. Después de la ligación, se repitió el mismo procedimiento que el descrito anteriormente y las células transformadas fueron plateadas en cajas de Luria conteniendo Cm (20µg/ml) + Km (25µg/ml) e incubadas a 30°C. De las colonias obtenidas, se purificó el plásmido pRMAK109 (figura 9), utilizando el Kit de Boehringer para ese propósito. Este plásmido su utilizó posteriormente para llevar a cabo el Knockout del gene de *tpi* de la cepa JM101 de *E. coli*, por medio de un evento de doble recombinación.

### **5.6 Propiedades del plásmido termosensible pRMAK109.**

El plásmido tiene dos genes que forman proteínas involucradas en la inactivación de los antibióticos Km y Cm. El gene de la Neomicina fosfotransferasa está flanqueado por secuencias homólogas presentes en el cromosoma de *E. coli*. Mediante un evento de doble recombinación es posible que la cepa silvestre adquiera el gene mutado de ésta manera y el fenotipo de la cepa mutante es kanamicina resistente (Km<sup>r</sup>) y cloramfenicol sensible (Cm<sup>s</sup>) (figura 10).

La proteína de replicación es sensible a temperatura, de tal forma que a 30°C se expresa y replica el plásmido, mientras que a temperaturas mayores (42 y 44°C) es completamente inactiva. Ante esta situación de estrés la bacteria termina por eliminar el plásmido sensible a temperatura en las siguientes divisiones celulares.

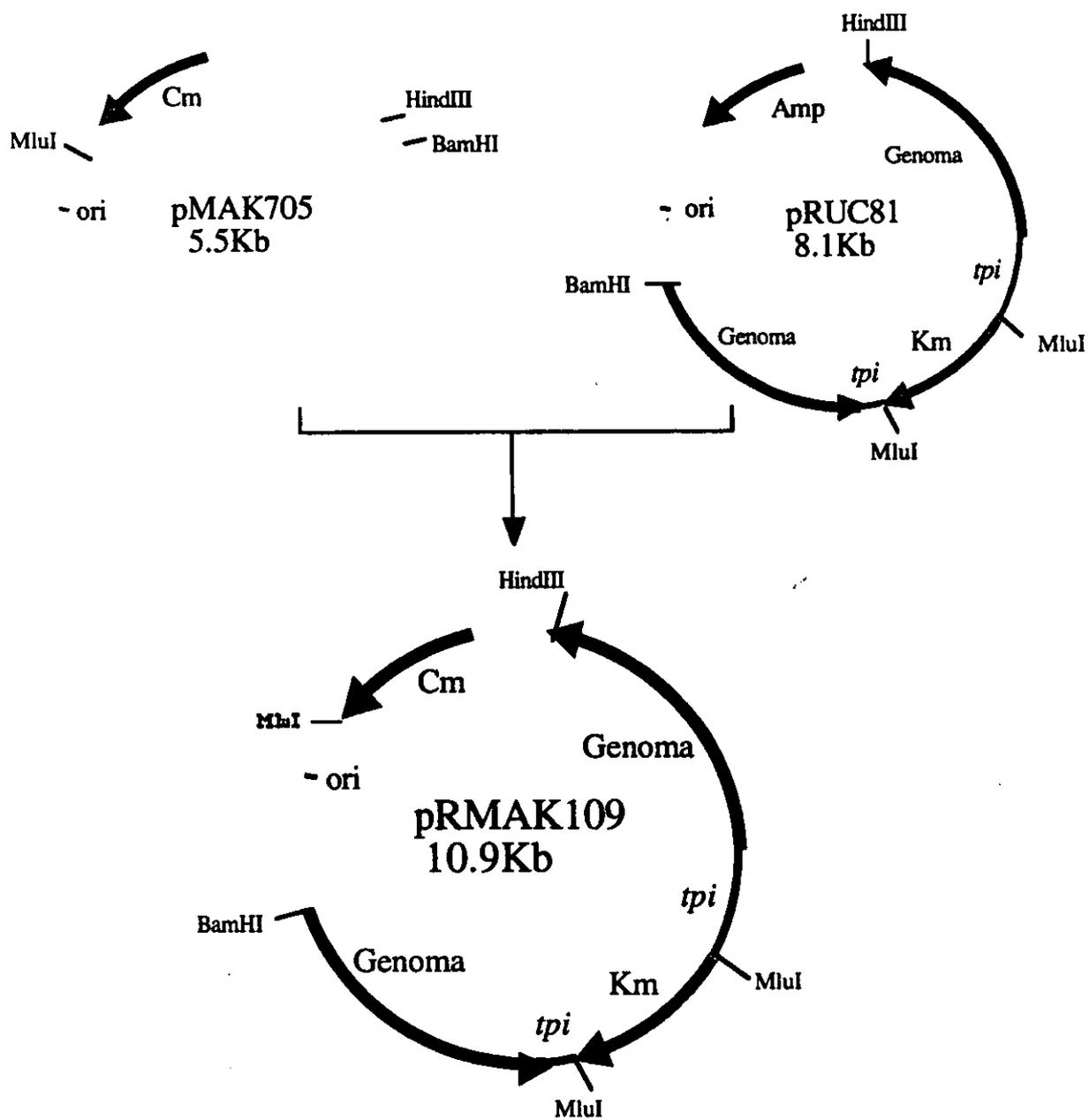


Figura 9. Construcción del plásmido pRMAK109 de 10.9 Kb.

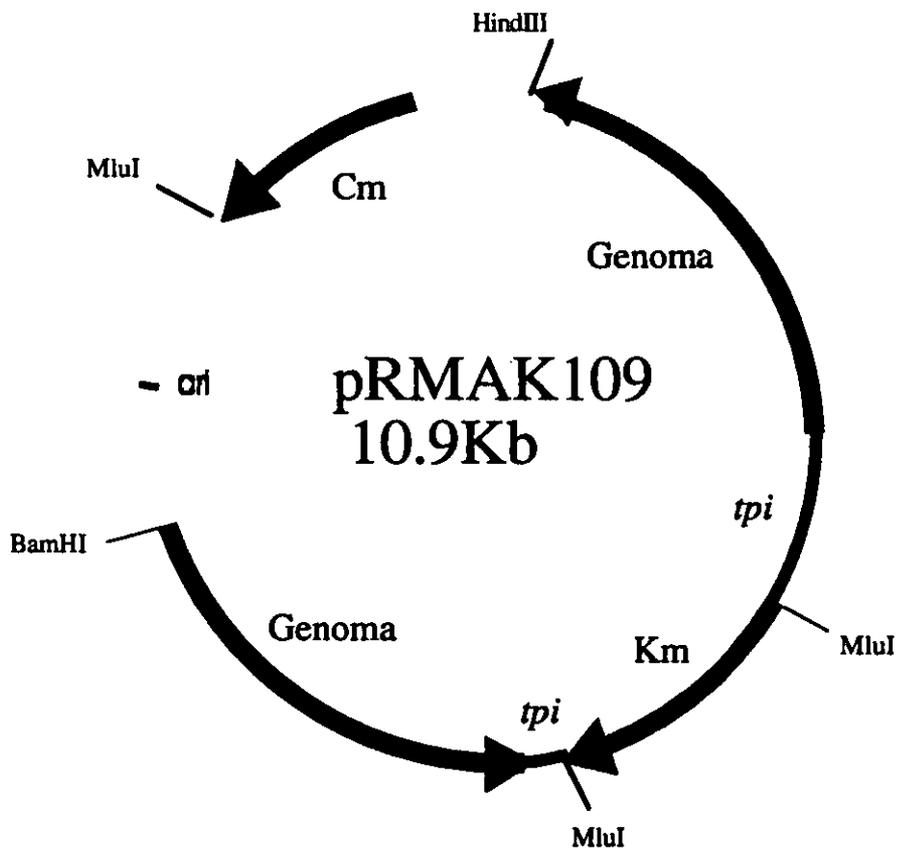


Figura 10. Características del plásmido pRMAK109. 1) Es un plásmido con bajo número de copias. 2) Con una replicación sensible a temperatura. 3) Presenta dos marcadores de selección distintos (uno de reemplazamiento Km) y el otro de pérdida del vector (Cm). 4) Lleva la secuencia genómica de 4.3 Kb de *E. coli*, más la inserción de la unidad de transcripción de NPTII en el gene *tpi*.

### 5.7 Knockout del gene *tpi* del cromosoma de *Escherichia coli*.

La interrupción del gene cromosomal se llevó a cabo por medio de un evento de doble recombinación entre dos regiones homólogas presentes en el vector de clonación pRMAK109 y el cromosoma de la cepa JM101 de *E. coli*. El plásmido pRMAK109 fué diseñado de tal forma que la información que flanquea las regiones de homología pueda pasar al cromosoma bacteriano insertando la unidad de transcripción de NPTII cuyo producto confiere resistencia a kanamicina, interrumpiendo de esta forma el gene *tpi* del cromosoma bacteriano (figura 11).

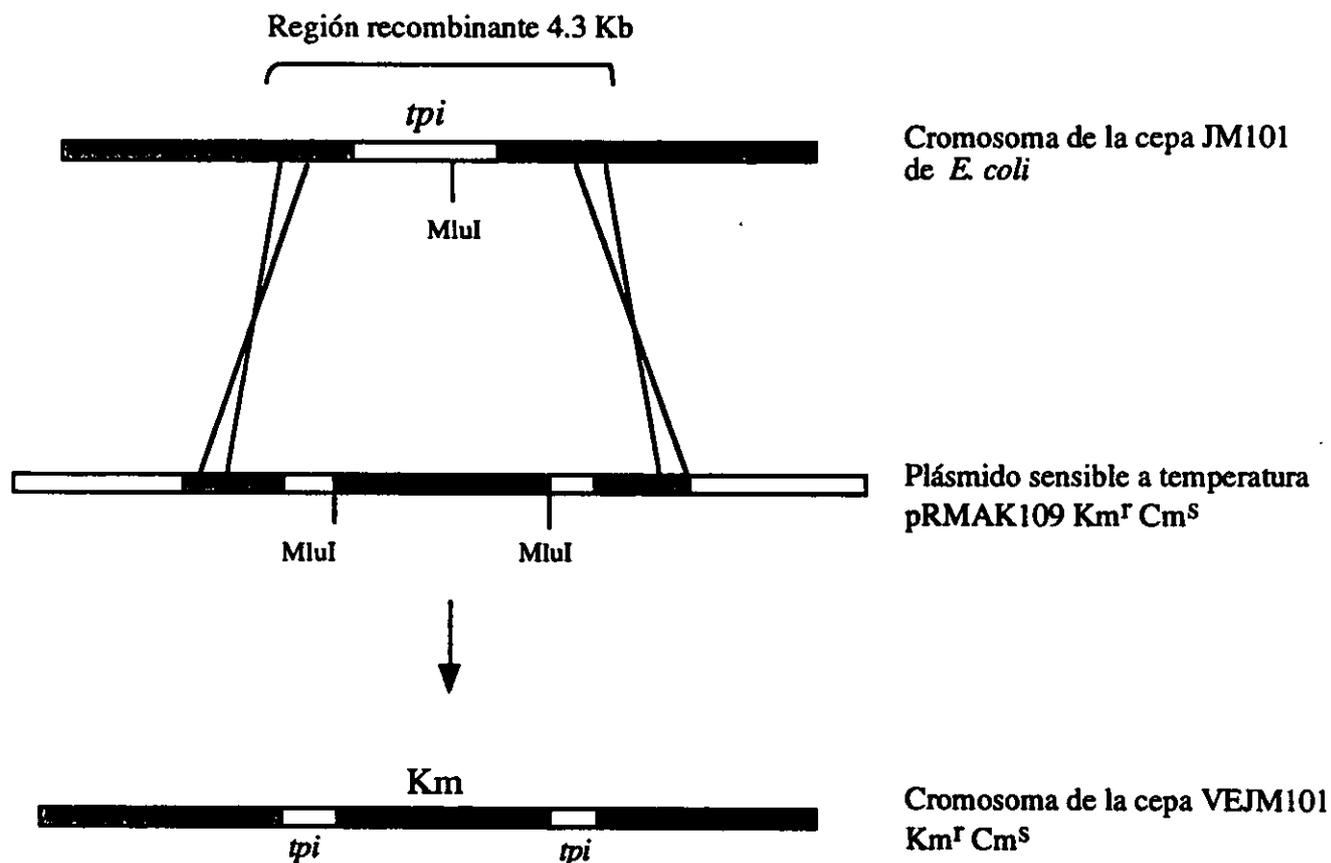


Figura 11. El Knockout del gene *tpi* del cromosoma de *E. coli*, por medio de un evento de doble recombinación.

### 5.8 Selección de las dobles recombinantes.

La selección está dada mediante la sensibilidad del plásmido pRMAK109 de replicarse a 44°C. Las colonias que aparecen a 44°C en presencia del antibiótico Km y son sensibles al antibiótico Cm, serán aquellas en las que se haya llevado a cabo la doble recombinación. Es necesario replicar estas colonias a 30°C en presencia de Cm para corroborar la pérdida del plásmido (figura 12).

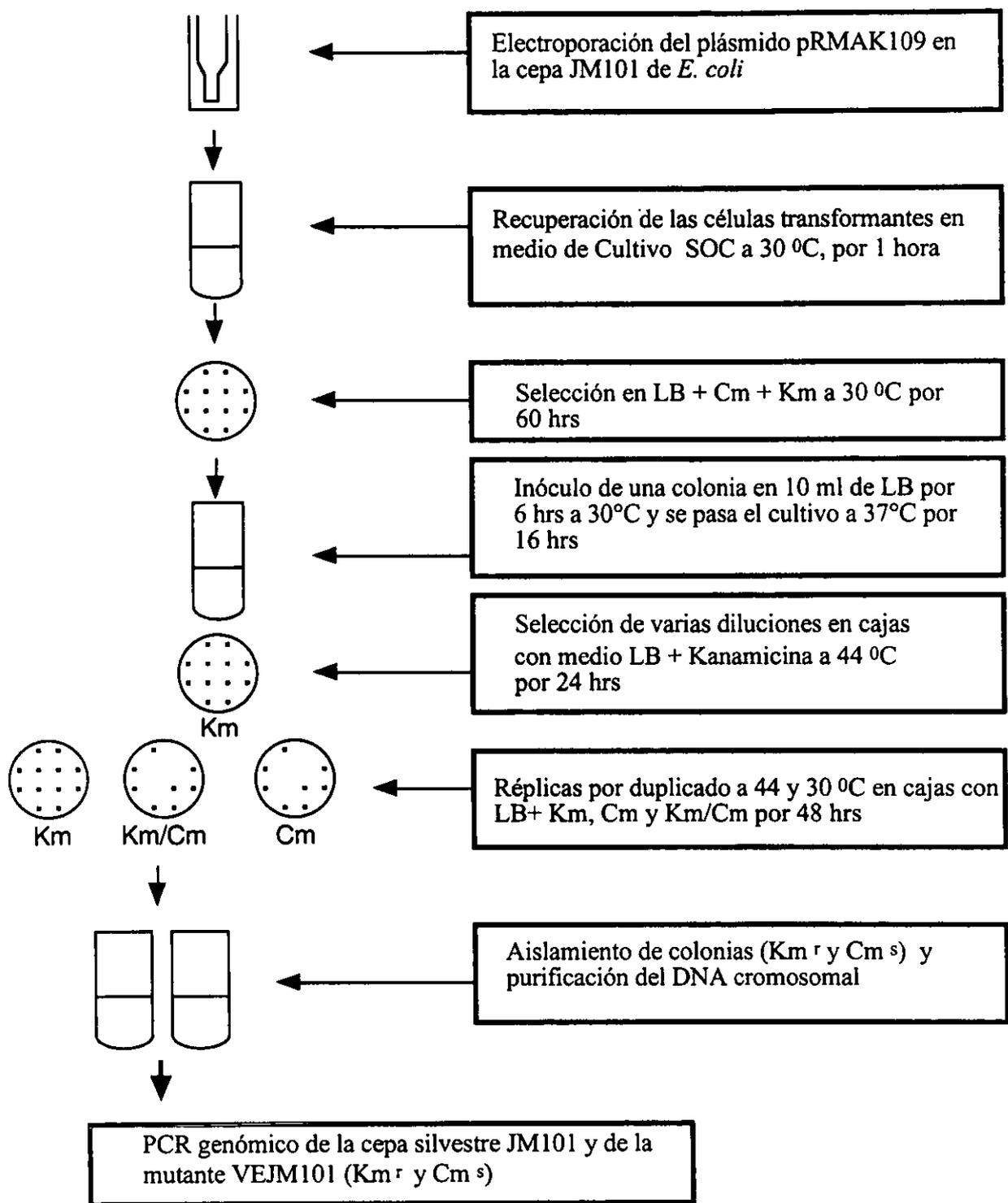


Figura 12. Selección de las dobles recombinantes.

Las células electrocompetentes de la cepa JM101 de *E. coli* fueron transformadas con 20 ng del vector pRMAK109. Después de un pulso de 0.8 KV, las células se recuperaron en 1 ml de medio SOC e incubadas a 30°C durante 1 hora. Posteriormente estas células fueron plateadas en cajas de Luria+Km (25 µg/ml)+Cm (20 µg/ml) e incubadas a 30°C durante 60 hrs. Se tomó una de la colonias seleccionadas en las cajas de Luria+Km +Cm y se inoculó en 10 ml de medio Luria suplementado con Km (25 µg/ml). Se incubó por 6 hrs a 30°C para permitir algunos ciclos de replicación del plásmido, posteriormente con el fin de enriquecer las células en las que el plásmido recombinó se transfirió a una incubadora a 37°C, en donde se mantuvo durante 16 hrs. Después de la incubación, se hicieron series de diluciones, las cuales se platearon en cajas con medio LB+Km (25 µg/ml) y se incubaron a 44°C durante 24 hrs.

Las colonias que crecieron bajo estas condiciones, son aquellas en que se llevó a cabo un proceso de recombinación (sencilla o doble). Para seleccionar las colonias en que se llevó a cabo un proceso de doble recombinación (que serían las únicas en las que el gene de *tpi* fue eliminado), se crecieron réplicas de 400 colonias en cajas con Km/Cm, Km y Cm tanto a 44°C como a 30°C y se incubaron durante 48hrs. Se buscaron aquellas colonias que fueran Km<sup>R</sup> y Cm<sup>S</sup> tanto a 44°C como a 30°C. De las 400 colonias analizadas solo una nos dio el fenotipo esperado.

Se prepararon gliceroles de la colonia que cumplió con el fenotipo anterior y se purificó el DNA cromosomal (Sambrook et. al., 1989), para verificar mediante PCR la interrupción del gene *tpi*. A la cepa resultante se le denominó VEJM101.

### **5.9 Análisis de los experimentos de complementación en medio mínimo M9 sólido con diferentes fuentes de carbono, plásmidos y cepas.**

Se prepararon cajas con medio mínimo (MM) sólido con 0.2% de glucosa o con 0.2% de glicerol. Los plásmidos empleados son: pBR322, pMono (pET3a+monoTIM, proteína 1000 veces menos activa que la WT TIM) y pBitim (pET3a+WT TIM); las cepas de *E. coli* empleadas fueron: la AA200, VEJM101 y la JM101. Para la realización de los experimentos de complementación se probaron diferentes diluciones de las células, colocando el mismo número de células por caja Petri. La dilución empleada fue de 10<sup>-6</sup>, agregando 100 µl y 200 µl por caja encontrando entre 100 y 200 colonias crecidas. El análisis se llevó a cabo por triplicado incubando por 37 hrs después de plaquear las cajas a 37 °C, por último se contaron el número de colonias formadas y se analizó el tamaño de las mismas.

### 5.10 Validación del intervalo dinámico de la cepa VEJM101 mediante experimentos de complementación en medio mínimo M9 sólido empleando diferentes fuentes de carbono y plásmidos generados.

Para la validación del intervalo dinámico se empleó la técnica de gota, mediante la cual se agregan gotas de la cepa VEJM101 con diferentes variantes de *tpi* a las cajas con medios selectivos, analizando el tamaño de las colonias, así como el tiempo de aparición de las mismas. Por cada gota de 10  $\mu$ l, se colocaron entre 30 y 40 células de la dilución  $10^{-4}$  de cultivos frescos con densidad óptica (D.O) de 0.5, son células potencialmente divisibles. Se realizaron los experimentos de complementación en la cepa VEJM101 (*tpi*-) la cual fue transformada con las siguientes variantes construídas del gene *tpi* de *Trypanosoma brucei* clonados en el plásmido pUC18: pUC18+WT TIM (enzima silvestre dimérica de *T. brucei*); pUC18+C14F (es una mutante de TIM 100 veces menos activa que la silvestre de *T. brucei* caracterizada por el grupo del Dr. Ruy Pérez Monfort); pUC18+monoTIM (enzima monomérica de TIM 1000 veces menos activa, diseñada por el grupo del Dr. Wierenga (Borchert et al, 1993 y Borchert et al, 1994); pUC18+las mutantes monoméricas 2.1 y 3 (diseñadas mediante la inserción del asa 3 original de la proteína dimérica en el asa 2 de monoTIM, son inserciones de aa hidrofóbicos). Las mutantes monoméricas mut 1 hasta mut 5 provienen de una construcción similar pero incluyendo residuos hidrofílicos y básicos en el asa 2 y finalmente se probó el pUC18 sólo. Se probaron diferentes condiciones de medio selectivo por triplicado; el análisis se llevó a cabo durante el transcurso de 96 hrs de haber goteado las cajas. Fué muy importante contabilizar las colonias, así como analizar el tamaño y el tiempo de aparición de las mismas.

Las condiciones de medio selectivo probadas fueron las siguientes: a) MM + glucosa 0.2%, b) MM + glucosa 0.2% + casaminoácidos 0.032%, c) MM + glucosa 0.2% + IPTG 0.5 mM + 0.032% de casaminoácidos, d) MM+glucosa 0.2% + IPTG 0.5 mM. Las siguientes combinaciones de fuentes de carbono se suplementan con 0.032% de casaminoácidos: e) MM + glucosa 0.2% + glicerol 0.1%, f) MM + glucosa 0.2% + glicerol 0.2%, g) MM+glucosa 0.1% + glicerol 0.1%, h) MM + glicerol 0.3%). Las siguientes condiciones llevan: i) glicerol al 0.1%, j) glicerol al 0.3%, k) glicerol al 0.3% + 0.032% de casaminoácidos, l) glicerol al 0.3% + 0.032% de casaminoácidos + 0.5 mM de IPTG. Todas las condiciones llevaron Amp (200 $\mu$ g/ml) + Km (25 $\mu$ g/ml) y fueron incubadas a 37°C.

## 5.11 Empleo de la evolución dirigida para la formación de mutantes más activas que la monoTIM.

### 5.11.1 Mutagénesis al azar del gene de la monoTIM y tamaño del banco.

El gene de monoTIM fue proporcionado por el laboratorio del Dr. Rick Wierenga (EMBL), este gene se encontraba clonado en el vector pET3a mediante los sitios de restricción NdeI.

Se realizaron PCRs mutagénicas al azar sobre el gene de la monoTIM con la finalidad de generar variabilidad en la secuencia, para posteriormente seleccionar las clonas más activas de monoTIM. La secuencia de los oligonucléotidos (EcoRI 40 amero y HindIII 35 amero), diseñados y empleados para la formación de las poblaciones de genes mutados se muestran en la figura 13. Las condiciones mutagénicas empleadas para la evolución dirigida fueron las descritas por Cadwell y Joyce (1992).

Las condiciones que se utilizaron para llevar a cabo las reacciones de PCR mutagénica fueron las siguientes:

PCR mutagénica de un reacción.

- 1.- DNA: 5 pmol/ $\mu$ l, usar 4  $\mu$ l
- 2.- Primer 40: 10 pmol/ $\mu$ l, usar 3  $\mu$ l
- 3.- Primer 35: 10 pmol/ $\mu$ l, usar 3  $\mu$ l
- 4.- 10X PCR buffer: 70mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCL, 100mM Tris (8.3).
- 5.- 10X dNTP mezcla: 2mM dGTP, 2mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dTTP
- 6.- 5 mM MnCl<sub>2</sub>
- 7.- Taq polimerasa (5U/ $\mu$ l)

Se utilizó el siguiente programa del termociclador:

95°C (desnaturalización)	60°C (alineamiento)	72°C (extensión)	# de ciclos
5 min	0	0	1
1min	1 min	2 min	30
0	0	10 min	1

Se realizaron 4 reacciones de PCR mutagénica independientes con la finalidad de obtener 8 picomoles de DNA purificados y digeridos del gene de la monoTIM. Las PCRs fueron mezcladas y purificadas de un gel de agarosa al 1% mediante el Kit de Qiagen para tal propósito.

Se digirieron por separado 4  $\mu$ g de pUC18 y 8  $\mu$ g de producto de PCR mutagénica de monoTIM, empleando las enzimas EcoRI y HindIII; en el caso de la digestión del pUC18 se adicionó además la enzima PstI para asegurar la destrucción del polilinker, en caso de que la

digestión con alguna de las otras dos enzimas hubiera sido incompleta, dejando la digestión toda la noche a 37°C. Los productos de digestión en ambos casos fueron purificados mediante electroforesis en un gel preparativo de agarosa al 1%. Las bandas cortadas de 2.8 Kb (pUC18) y 0.76 Kb (gene de monoTIM), fueron purificados de agarosa mediante el Kit de Qiagen para tal propósito. Después de verificar la cantidad aproximada de cada purificación se pusieron a ligar 1pmol de pUC18 con 8 picomoles de inserto en un volumen final de 200 µl, dejando la ligación toda la noche a 16°C. El producto de la ligación se precipitó con butanol y la pastilla seca se disolvió en 20 µl de agua destilada, de los cuales la mitad se utilizó para electroporar 200µl de células electrocompetentes de la cepa XL1BLUE de *E.coli* (*tpi*<sup>+</sup>, la cual es una cepa con buena eficiencia de transformación), con un pulso de 2.5 KV y su posterior recuperación en 2 ml de medio SOC.

Se realizó una estimación del número de colonias transformantes plateando 1µl en cajas con medio LB, encontrándose que el tamaño del banco inicial fue de 5X10<sup>6</sup> transformantes; el resto del banco fué crecido en medio LB líquido, con la finalidad de multiplicarlo. Se extrajo el plásmido del banco mediante el kit de Boehringer, posteriormente se realizó una retransformación en la cepa VEJM101 (*tpi*<sup>-</sup>) empleando 3µg de este DNA en 200µl de células, con un pulso de 2.5 KV y su posterior recuperación en 2 ml de medio SOC. Se realizó la cuantificación del número de colonias en cajas con medio LB plateando 1µl, el análisis reflejó que se tenía un banco de 1X10<sup>8</sup> transformantes, el resto del banco se distribuyó en cajas y matraces con medios selectivos.

### **5.11.2 Selección de las proteínas más activas que monoTIM.**

Se realizaron dos tipos de selección para los genes formados por la PCR mutagénica y como consecuencia las proteínas que derivan de tales mutaciones, empleando como única fuente de carbono a la glucosa al 0.2%+0.5mM de IPTG con 0.032% de casaminoácidos y sin casaminoácidos. Este último es un medio más estricto para la selección de una actividad de TIM. Con el fin de realizar un análisis comparativo con respecto a las mutantes formadas por la evolución dirigida, el gene de la monoTIM también fue subclonado en el plásmido pUC18 y transformado bajo las mismas condiciones. Para el análisis de complementación se realizaron los mismos tipos de selección que en el caso anterior.



### 5.11.3 PCR diagnóstico de las variantes seleccionadas en los medios selectivos.

Se realizaron PCRs diagnósticos de las variantes más activas que monoTIM, para excluir la presencia de enzimas diméricas introducidas por contaminación en la PCR, para lo cual fué necesario emplear un oligo específico del asa 3 de la enzima dimérica (WT TIM) y el oligo EcoRI 40mero. De tal forma que si hay dímeros en las variantes seleccionadas se forma un producto de 250 pb por PCR. Sin embargo, si las enzimas parten del gene monomérico, las clonas seleccionadas no dan reacción en la PCR.

Los oligonucleótidos empleados son:

Oligo EcoRI 5' TAATTTTGTGAATTCTAAGAAGGAGATATACATATGTCC 3'

Oligo 6 diagnóstico del Loop3 5' GGCACCGCTCTTTGCAATGG 3'

Las condiciones del termociclador fueron:

95°C (desnaturalización)	60°C (alineamiento)	72°C (extensión)	# de ciclos
5 min	0	0	1
1min	1 min	2 min	30
0	0	10 min	1

### 5.11.4 Secuenciación de los genes que codifican para proteínas más activas que monoTIM.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo empleando los oligos universales del plásmido pUC18, mediante un secuenciador automático en la unidad de secuencia del IBT.

### 5.11.5 Estrías de diferentes variantes de TIM en cajas con medios selectivos y medio LB.

Se estriaron por triplicado, diferentes variantes de TIM clonadas en el plásmido pUC18 y transformadas en la cepa VEJM101 en cajas con medios selectivos conteniendo glucosa 0.2% + IPTG 0.5mM + 0.032% de casaminoácidos + Amp (200 µg/ml) + Km (25 µg/ml) y glucosa 0.2% + IPTG 0.5mM + Amp (200 µg/ml) + Km (25 µg/ml) sin casaminoácidos, para corroborar que todas las construcciones fueron estriadas también se empleó medio rico LB+Amp (200 µg/ml) + Km (25 µg/ml), analizándose el tamaño y el tiempo de aparición de las colonias.

Los plásmidos contruídos para las complementaciones son los siguientes: pUC18+WT (enzima dimérica de *T. brucei* clonada en el vector de expresión), pUC18+C14F (C14F es una mutante 100 veces menos activa que la WT TIM de *T. brucei*, caracterizada por el grupo del Dr. Pérez Monfort, pUC18+mono TIM (mono TIM es una mutante monomérica 1000 veces menos activa que WT TIM), pUC18+la mutante S43P, T44A y A179T denominada E (esta mutante monomérica fue seleccionada de la condición de MM sin casaminoácidos), pUC18+la mutante S43P, T44S y N208S denominada V (esta mutante fue seleccionada de la condición de MM con casaminoácidos) y pUC18 sólo como control negativo.

### 5.11.6 Cinéticas de crecimiento

Antes de realizar las cinéticas de crecimiento de las diferentes variantes de *tpi*, fue necesario hacer preinóculos en medio LB por triplicado, los cuales fueron incubados durante toda la noche a 37°C. Se determinó la D.O. de los diferentes cultivos y se estandarizaron en una misma D.O. con el fin de poner el mismo número de células como inóculo.

Para la realización de las cinéticas de crecimiento se utilizó el mismo número aproximado de células como inóculo (lavadas dos veces con medio mínimo estéril para eliminar los restos del medio LB). Los inóculos se llevaron a cabo en tubos de ensayo (PYREX 13X100 mm), con 3 ml de medio mínimo con glucosa 0.2% + IPTG 0.5 mM, probando la condición de medio mínimo sin casaminoácidos. Los cultivos fueron analizados por triplicado, midiendo cada hora la D.O a 600 nm con el equipo Spectronic 20 (BAUSCH y LOMB). Las muestras fueron incubadas a 37°C, en agitación constante.

Las cepas con las siguientes construcciones que se verificaron en las cinéticas de crecimiento presentan las siguientes características: JM101 (cepa de *E. coli* que presenta el gene de la TIM dimérica cromosomal), JM101+pUC18 (cepa de *E. coli* que presenta el gene cromosomal de TIM en presencia de una carga metabólica). En la cepa VEJM101 se probaron las siguientes variantes: pUC18+WT TIM; pUC18+C14F; pUC18+monoTIM; pUC18+la mutante monomérica V (S43P, T44S y N208S), pUC18+la mutante monomérica E (S43P, T44A y A179T ). El pUC18 es nuestro control negativo debido a que no presenta el gene *tpi*. En cuanto a las cepas, empleamos la VEJM101 (*tpi* -) y la JM101 (*tpi* +), ésta última presenta actividad de TIM silvestre.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Obtención de la secuencia genómica de *E. coli* mediante PCR y comprobación de su identidad por análisis de restricción.

En todas las condiciones probadas se encontraron algunos subproductos debido al pegado inespecífico de los oligos, purificándose sólo el fragmento que correspondía en tamaño al producto de interés (4.3 Kb) y se seleccionó la temperatura de 54°C para el alineamiento, donde se observó una mayor concentración del producto de 4.3 Kb (figura 14).

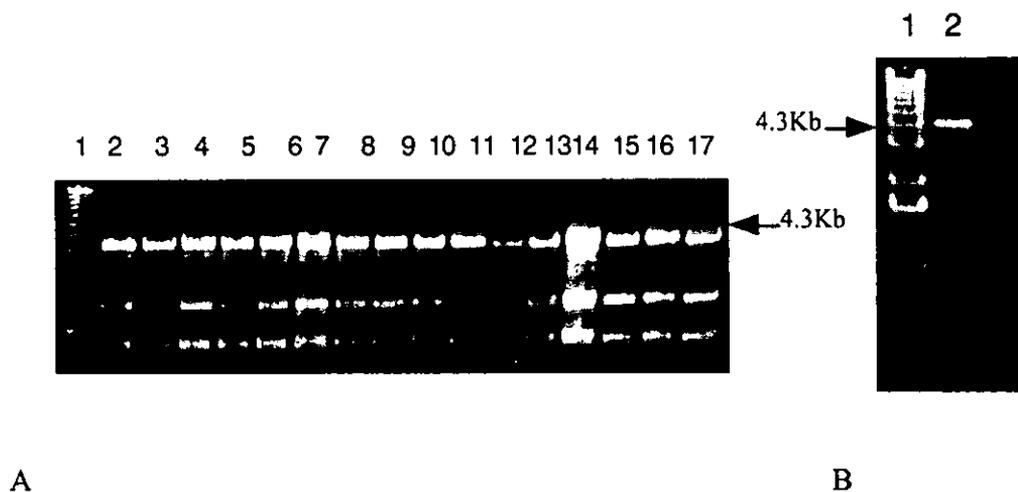


Figura 14. PCR de DNA cromosomal de la cepa JM101 con oligos que pegan en las regiones flanqueantes al gene de *tpi*. A) gradiente de temperatura: carril 1 marcador de peso molecular de 1Kb DNA Ladder ; carriles 2 al 17 productos de PCR genómico a diferentes temperaturas (50, 52, 54 y 56 °C) y aumento en la concentración de DNA (diferentes volúmenes de DNA). Carriles 2 a 5 (0.5  $\mu$ l de DNA genómico) las temperaturas se variaron de 50 a 56 °C. Carriles 6 a 9 (1  $\mu$ l de DNA genómico), las temperaturas se variaron de 50 a 56 °C. Carriles 10 a 13 (1.5  $\mu$ l de DNA genómico), las temperaturas se variaron de 50 a 56 °C. Carriles 14 a 17 (2  $\mu$ l de DNA genómico), las temperaturas se variaron de 50 a 56 °C. B) Producto de PCR genómico de 4.3 Kb purificado. Carril 1, marcador de peso molecular de 1Kb; carril 2, producto de PCR digerido con HindIII y BamHI.

Después de purificar el producto de 4.3 Kb de la reacción de la PCR, se llevaron a cabo digestiones con las enzimas de restricción (BamHI, HindIII, AvalI y MluI), para comprobar el patrón de digestión esperado en base a la secuencia obtenida de la base de datos del genoma de *E. coli* para dicho producto. Los fragmentos obtenidos corresponden al tamaño esperado de acuerdo a la secuencia (figura 15).

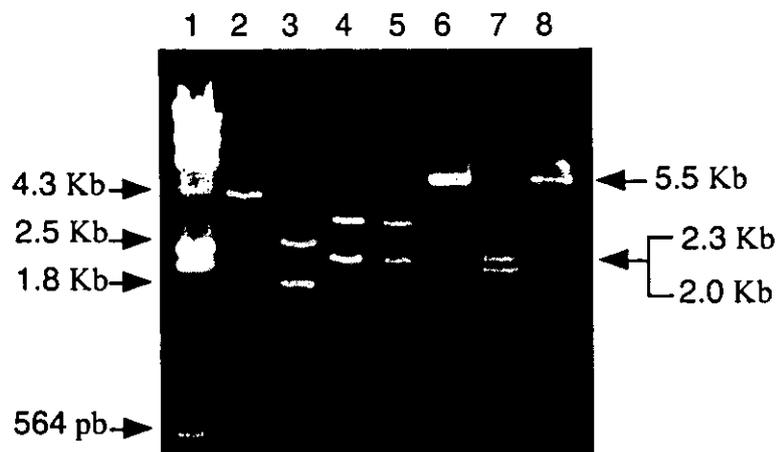


Figura 15. Producto de PCR genómico de *E. coli* (4.3 kb), digerido con diferentes enzimas de restricción. Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$  HindIII; carril 2 digestión con BamHI/HindIII; carril 3 digestión con AvaII; carril 7 digestión con MluI. Digestiones del plásmido pMAK705. Carriles 4 y 5 con AvaII; carril 6 con BamHI y HindIII y carril 8 digestión con MluI.

## 6.2 Construcción de los plásmidos para la formación del plásmido pRMAK109.

### 1) Plásmido pRUC7.

Este plásmido se deriva de la clonación del producto de PCR de 4.3 Kb en pUC18 por medio de los sitios de restricción BamHI y HindIII. Se empleó el plásmido pUC18 ya que contiene un “polylinker” en el cual se encuentran como sitios únicos BamHI y HindIII y a diferencia del vector pMAK705 no presenta ningún sitio MluI, de manera que el único sitio de MluI presente está en el gene *tpi* de *E. coli*. Después de purificar el plásmido pRUC7 de las colonias transformantes, se digirió con MluI obteniéndose un fragmento de 7Kb (figura 16).

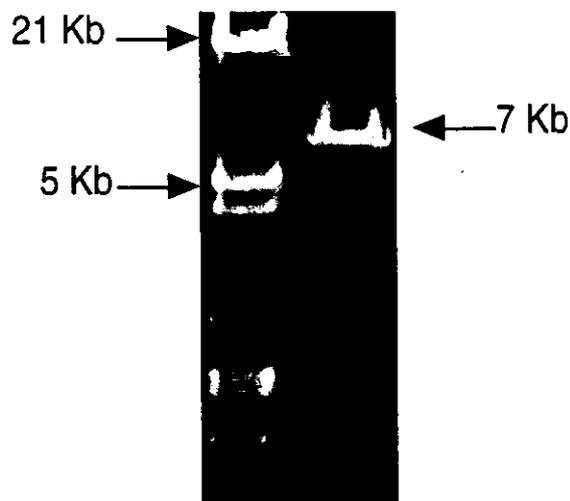


Figura 16. Digestión del plásmido pRUC7 con MluI, para comprobar la presencia del inserto. En el carril 1 está el marcador de peso molecular  $\lambda$  EcoRI-HindIII y en el carril 2 esta el plásmido pRUC7 digerido con MluI.

## 2) Plásmido pRUC81.

El plásmido pRUC81 se derivó de la inserción de la unidad transcripcional de la Neomicina fosfotransferasa en el sitio de MluI del plásmido pRUC7 para interrumpir el gene *tpi*.

La razón por la cual el sitio *Ava*II no fué empleado para interrumpir el gene *tpi* por el interposón de la kanamicina, radica en que este sitio está presente varias veces en los plásmidos pUC18 y pMAK705, de tal forma que dificulta la interrupción del gene *tpi* en el fragmento genómico de *E. coli*. Para evitar este problema, se usó el sitio MluI que aunque está presente en el plásmido pMAK705 no está presente en el pUC18.

La selección de clonas con inserto se hizo plateando en medio Luria, suplementado con Km y Amp. Se tomó una de las colonias resultantes, de la cual se purificó el plásmido pRUC81, el cual se digirió con MluI para checar la presencia del interposón de Km (figura 17).

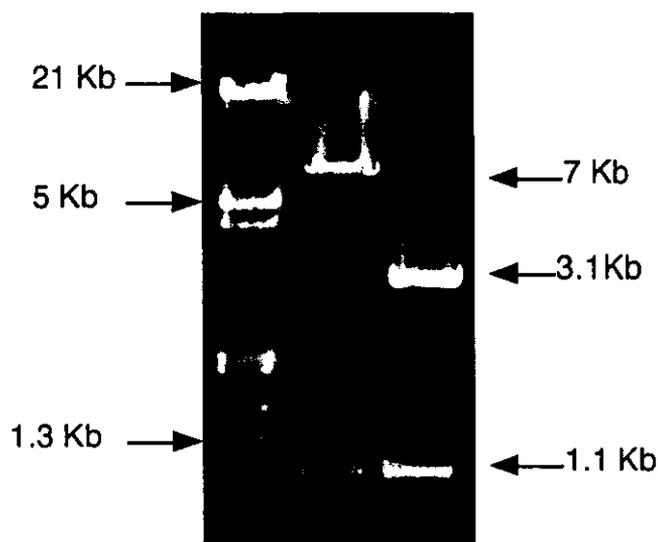


Figura 17. Digestiones con MluI de los plásmidos pRUC81 y pBSL98 (de donde se obtuvo la unidad transcripcional de la Neomicina fosfotransferasa), carriles 2 y 3 respectivamente; en el carril 1 esta el marcador de peso molecular  $\lambda$  EcoRI-HindIII. Del pBSL98 se obtuvo la unidad transcripcional de la Neomicina fosfotransferasa, contenida en el fragmento de 1.1 Kb.

### 3) Plásmido pRMAK109.

El plásmido pRMAK109 de 10.9 Kb proviene de la subclonación del fragmento BamHI/HindIII de 5.4 Kb del plásmido pRUC81 en pMAK705. El pRMAK705 tiene presente un sitio de MluI, al insertar el producto de 4.3 Kb + interposición de NPTII de 1.1 Kb, adquiere dos sitios más MluI, de tal forma que al realizar una digestión con dicha enzima el resultado es la formación de 3 fragmentos de diferente peso molecular. Dos de los fragmentos presentan un peso molecular muy similar (5 y 4.8 Kb), mientras que el tercer fragmento es de 1.1 Kb (corresponde al tamaño del interposición). Todas las clonas analizadas mostraron los fragmentos esperados (figura 18).

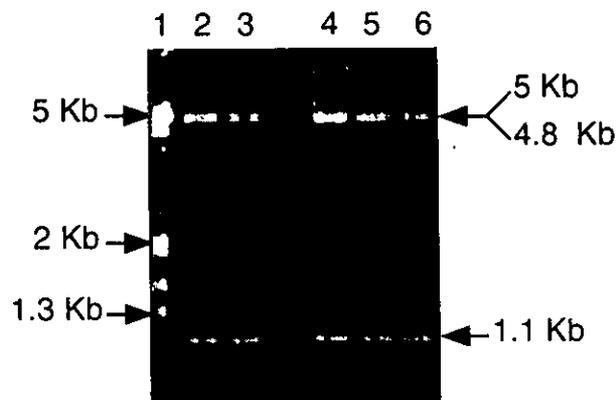


Figura 18. Digestiones con MluI de diferentes clonas del pRMAK109 carriles 2-6 se observan 3 fragmentos de distinto peso molecular, en el carril 1 esta el marcador de peso molecular  $\lambda$  EcoRI-HindIII.

### 6.3 Selección e identificación de las dobles recombinantes.

A 30°C el plásmido pRMAK109 sensible a temperatura dirige la sobrevivencia de la bacteria, mientras que a 44°C, la proteína responsable de la replicación del plásmido ya no puede realizar su función debido a que se encuentra desplegada; debido a esto, el plásmido se pierde en las siguientes divisiones celulares. En un evento de doble recombinación sólo se gana la resistencia a un antibiótico, en este caso a kanamicina. Las colonias que adquirieron la resistencia a los dos antibióticos, son aquellas en las que se llevó a cabo un evento de recombinación sencilla y por tanto queda una copia íntegra del gene *tpi* en el cromosoma.

De las 400 colonias analizadas, sólo una clona mostró el fenotipo esperado ( $Km^r$  y  $Cm^s$ ). Esta clona fue denominada VEJM101, crece en presencia de kanamicina en todas las temperaturas (44, 37 y 30 °C) y es incapaz de crecer en Cm en las mismas temperaturas (figura 19).

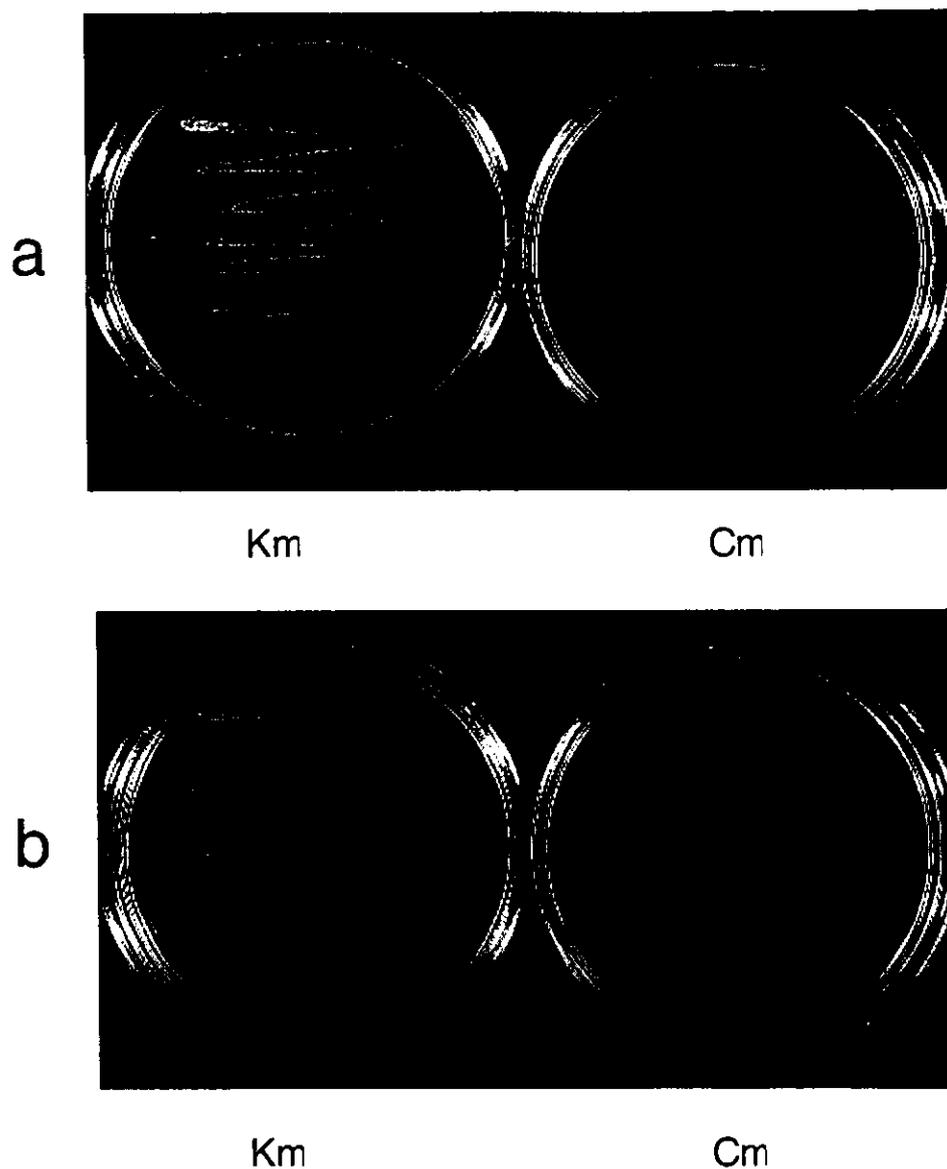


Figura 19. Crecimiento de la cepa doble recombinante (VEJM101), la cual es resistente a kanamicina y sensible a cloramfenicol en las diferentes temperaturas 44 (a) y 30°C (b) respectivamente.

#### 6.4 Comprobación del Knockout del gene *tpi* genómico mediante la PCR.

Se compararon los patrones de bandas de los productos de PCR formados de los genomas de las cepas JM101 (cepa silvestre) y la cepa VEJM101 ( $Km^r$ ,  $Cm^s$  a 44°C). Los oligonucleótidos

(EcoRI y HindIII), empleados para amplificar la secuencia de 4.3 Kb del cromosoma de la cepa silvestre JM101, fueron también utilizados para amplificar la secuencia cromosomal de 5.4 Kb de la cepa VEJM101. El PCR se llevó a cabo empleando la misma concentración de DNA que la cepa silvestre en un volumen de 1µl y bajo las mismas condiciones.

El análisis por PCR confirmó la presencia de un fragmento de mayor tamaño en la cepa VEJM101 que el obtenido con DNA cromosomal silvestre. La banda de 5.4 Kb corresponde al fragmento amplificado con la inserción del interposón de la kanamicina (figura 20).

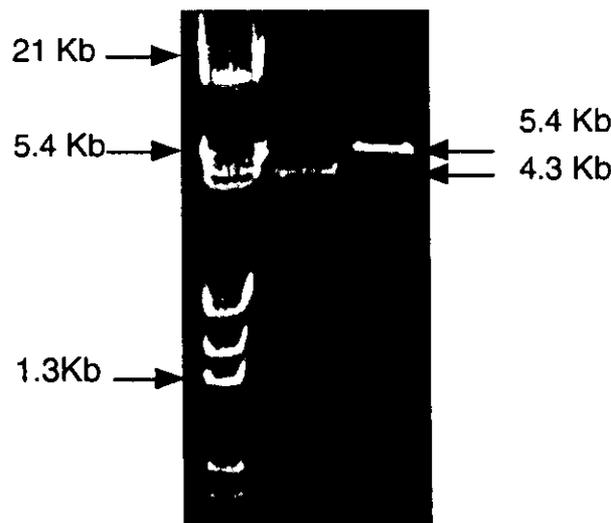


Figura 20. PCR genómico de la cepa JM101 y VEJM101 de *E. coli*. En el carril 1 está el marcador de peso molecular  $\lambda$  EcoRI-HindIII; en el carril 2 esta el producto de 4.3 Kb (JM101) y en el carril 3 el producto de 5.4 Kb (VEJM101).

### 6.5 Análisis de los experimentos de complementación en medio mínimo (MM), empleando diferentes fuentes de carbono, cepas y vectores.

Se determinaron las condiciones de crecimiento en medio mínimo suplementado ya sea con 0.2% glucosa o con 0.2% glicerol como únicas fuentes de carbono. Con este análisis se obtuvieron las características de crecimiento y selección de la cepa VEJM101, comparado con las cepas AA200 y JM101 (ver tabla 2).

**MM+Glucosa 0.2%**

Cepas	Plásmidos		
	pBR322	pMono*	pBi TIM*
AA200	-	+	++
VEJM101	-	+	+++++
JM101 (wt)	+++++	+++++	+++++

**MM+Glicerol 0.2%**

AA200	-	-	-
VEJM101	-	-	++++
JM101 (wt)	+++++	+++++	+++++

Tabla 2. Crecimiento de las cepas *tpi*- con los diferentes plásmidos después de 37 hrs de incubación a 37°C. Complementación de las cepas *tpi*- (AA200 y VEJM101) y cepas *tpi*+ (JM101 wt) con diferentes plásmidos crecidas en medio mínimo con glucosa y medio mínimo con glicerol. Los signos negativos (-) indican la falta de colonias; mientras que los signos positivos (+) indican el crecimiento de colonias. La cantidad de signos positivos reflejan el tamaño de las colonias.

\* Los genes de las enzimas TIM monomérica y dimérica fueron clonados en el plásmido pET3a bajo la expresión de un promotor T7, cuya polimerasa no existe en las cepas empleadas. Sin embargo, la observación de la complementación indica que hay una producción de escape de las proteínas suficiente como para lograr la complementación de la función.

Características de las cepas empleadas: cepa AA200 (*tpi*-), generada por mutagénesis química; cepa VEJM101 (*tpi*-), generada por medio de un evento de doble recombinación, mediante el cual se interrumpe el gene *tpi* con una cassette que introduce el gene que codifica para la proteína NPTII y la cepa JM101 (*tpi*+) es la cepa silvestre.

Características de los plásmidos empleados: El plásmido pBR322 fue empleado como control negativo debido a que es un vector que da resistencia a Ampicilina pero que no contiene el gene *tpi*; el plásmido pMono (formado por el vector PET3a + el gene de la monoTIM) y el plásmido pBiTIM (formado por el vector PET3a + el gene de la enzima dimérica de *T. brucei*).

La cepa VEJM101 perdió su actividad de *tpi* cromosomal ya que no es capaz de crecer en medio mínimo con glucosa 0.2% al ser transformada con el plásmido pBR322 y es capaz de ser complementada con isomerasas heterólogas de *Typanosoma brucei* en los plásmidos pBiTIM y pMono (figura 21).

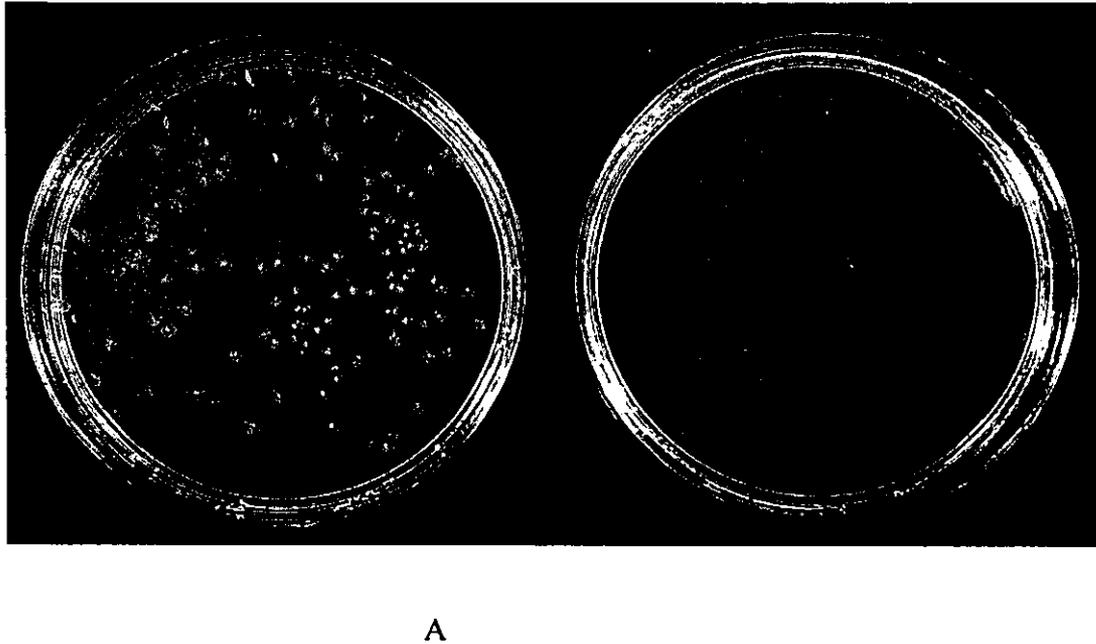


Figura 21. Complementación de la cepa VEJM101 con los plásmidos A) pBiTIM y B) pBR322 crecidas en medio mínimo con glucosa 0.2% a las 37 horas a temperatura de 37°C.

Para el caso de las cepas que fueron complementadas con los distintos plásmidos en la condición de MM + glucosa 0.2%, se observó una diferencia en el crecimiento de la cepa AA200 con los plásmidos pMono y pBiTIM, ya que las colonias encontradas de BiTIM son más grandes que las provenientes de la complementación con la enzima monomérica. Sin embargo, los resultados encontrados para la cepa VEJM101 con estos vectores, muestran una diferencia dramática en el crecimiento de colonias transformadas con el vector conteniendo el gene que codifica para las enzimas monoméricas y diméricas, siendo las colonias de BiTIM más grandes que las de monoTIM. Al ser transformada con los distintos plásmidos, la cepa JM101 (wt) muestra un crecimiento mayor de colonias en tiempos mas cortos, debido a que tiene su genoma intacto.

La cepa AA200 muestra una alta tasa de reversión, razón por la cual no fue empleada. Este es un problema cuando se desea seleccionar enzimas con actividades enzimáticas vestigiales, mientras que la cepa VEJM101 no presenta este problema. En experimentos posteriores la alta tasa de reversión fue el motivo principal que nos llevó a no usar la cepa AA200.

En las cepas que fueron complementadas con los distintos plásmidos en la condición de MM + glicerol al 0.2%, se observó que ninguna de las construcciones fue capaz de complementar a la cepa AA200. Esto es muy importante ya que se esperaría que BiTIM fuera capaz de complementar, lo que sugiere la posible existencia de más mutaciones en el resto del genoma en la cepa AA200, además de la mutación en el gene *tpi*. En contraste, los resultados encontrados para la cepa VEJM101 con estos vectores fueron muy alentadores, por la presencia de colonias de gran tamaño provenientes de la complementación de la cepa VEJM101 con el plásmido pBiTIM, demostrando la utilidad de la enzima heteróloga. Es importante mencionar que en un medio selectivo cuya fuente de carbono es glicerol, se forma directamente dihidroxiacetona fosfato que de no ser isomerizada, se metaboliza para dar lugar a la formación de metilglioxal; este compuesto es altamente tóxico para la célula (Krymkiewiez et al., 1971). La única forma de sobrevivencia está dada por la presencia de una TIM activa (figura 22). La cepa JM101 no presentó ningún problema de crecimiento en la condición de glucosa 0.2% mostrando colonias de mayor tamaño en todos los casos, sin embargo, cabe mencionar que el tamaño de las colonias fue menor cuando se utilizó glicerol al 0.2% como única fuente de carbono. Este comportamiento se observó en todos los casos. El atraso en el tamaño de las colonias, se debe muy probablemente a que se está produciendo metilglioxal en cantidades pequeñas que frenan la división celular de *E. coli*, pero no la matan debido a que la mayor parte de la DHAP es isomerizada a GAP alimentando la vía metabólica de la glucólisis hasta la formación de piruvato, el cual posteriormente será modificado a acetil CoA para obtener energía en el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa. Esto apoya la idea de que sólo la cepa que tenga una TIM eficiente será capaz de crecer en medio mínimo cuya única fuente de carbono sea glicerol.

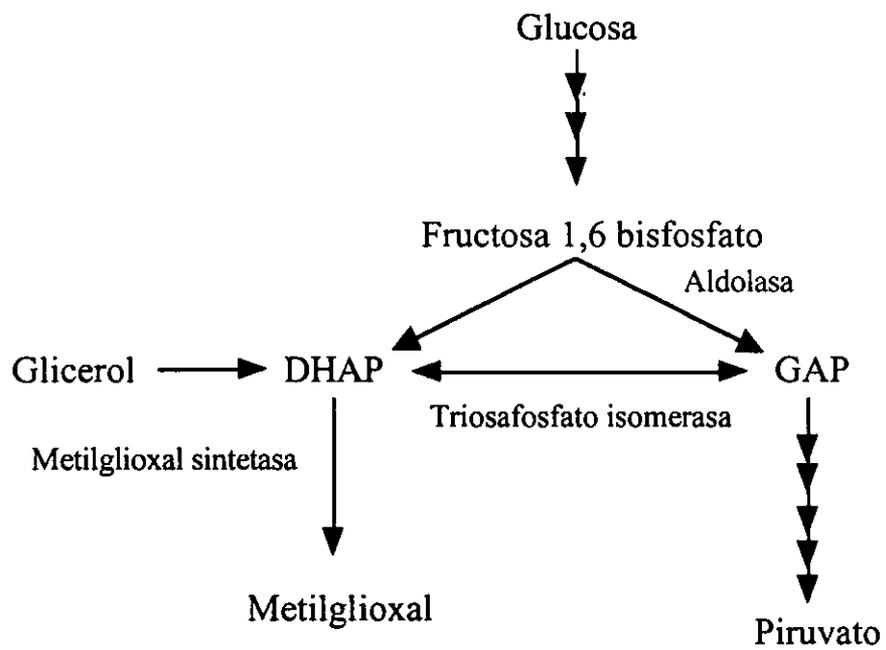


Figura 22. Formación de metilglioxal a partir de la metilglioxal sintetasa, este compuesto al acumularse es tóxico para la célula.

## 6.6 Rango dinámico de la cepa de selección VEJM101.

Para determinar el rango dinámico de actividad de la cepa VEJM101, se evaluaron diferentes condiciones de crecimiento usando la técnica de gota, complementando la función de *tpi* con mutantes de diferentes actividades conocidas para algunos casos. Los resultados de algunas de las condiciones de selección se muestran en la tabla 3.

**Plásmidos** **condiciones de selección**

	MM+ 0.2% Glucosa	MM + 0.2% Glucosa + Casaminoácidos	MM + 0.2% Glucosa + IPTG + Casaminoácidos	MM + 0.2% Glucosa + IPTG	MM + 0.1% Glicerol	MM +0.3% Glicerol	MM +0.3% Glicerol + IPTG+ Casaminoácidos
pUC18 + monoTIM	—	++	+++	—	—	—	—
pUC18 + C14F	+++	+++++	+++++	++++	+	—	—
pUC18+WTTIM	++++	+++++	+++++	++++	++	+	++
pUC18	—	—	—	—	—	—	—
pUC18 + mut2.1	—	—	—	—	—	—	—
pUC18 + mut5.1	—	—	—	—	—	—	—
pUC18 + mut13	—	—	—	—	—	—	—
pUC18 + mut1	—	—	—	—	—	—	—
pUC18+ mut5	—	—	—	—	—	—	—

Tabla 3. Crecimiento de la cepa VEJM101 complementada con diferentes plásmidos y mutantes de *tpi* de diferente actividad bajo distintas condiciones de crecimiento. Las cepas fueron crecidas a 37°C durante 96 hrs. \* Los signos negativos indican la falta de colonias, mientras que los signos positivos indican la presencia de colonias, la cantidad de signos positivos representan de una manera comparativa el tamaño de las colonias. \*\* La concentración de casaminoácidos es de 0.032% y la de IPTG es de 0.5 mM. \*\*\* Todas las construcciones fueron clonadas en pUC18 con la finalidad de que los genes fueran expresados a partir de un promotor que reconociera la RNA polimerasa bacteriana.

La tabla 3 muestra el análisis de los experimentos de complementación realizados por triplicado en distintas variantes de TIM las cuales presentan las siguientes características: pUC18 +

monoTIM de Wierenga (Borchert et al, 1993 y Borchert et al, 1994); pUC18 + C14F; pUC18 + WT TIM; pUC18 es nuestro control negativo debido a que no presenta gene *tpi*. Las mutantes monoméricas: mut 2.1, mut 5.1 y mut 13, son mutantes diseñadas mediante inserción del asa 3 original de la proteína dimérica en el asa 2 de monoTIM (son inserciones de aa hidrofóbicos). Las mutantes monoméricas: mut 1 hasta mut 5 provienen de una construcción similar pero incluyendo residuos hidrofílicos y básicos en el asa 2, para aumentar la solubilidad de la enzima diseñada. Las construcciones de las inserciones de aa hidrofóbicos e hidrofílicos fueron diseñadas y construídas por los Dres. Saab y Horjales.

Al complementar la cepa de *E. coli* VEJM101 con estas variantes de TIM, se generaron diferentes fenotipos, los cuales se evaluaron en distintas condiciones de selección mostrando los siguientes resultados.

En los medios que contenían sólo glucosa, no se había logrado la formación de colonias con el gene monomérico en experimentos anteriores. Sin embargo, al adicionar casaminoácidos 0.032% a nuestro medio selectivo se observó por primera vez, la formación de colonias muy pequeñas de monoTIM a las 40 hrs de haber inoculado las cajas, también incrementan su tamaño las colonias de C14F y WTTIM, siendo mayores estas últimas. El resto de las variantes construídas no fueron capaces de complementar a la cepa VEJM101 durante más de 96 hrs de incubación al igual que el pUC18 sólo.

Al adicionar IPTG 0.5 mM a este nuevo sistema selectivo, se observó un incremento en todas las colonias en general, debido a que en nuestro sistema la expresión del gene *tpi* de *T. brucei* se encuentra controlada por LacI (represor). El IPTG anula la función de este represor cuya función es evitar que la RNA polimerasa transcriba el gene de monoTIM. Al interaccionar el IPTG con el represor, éste ya no puede unirse a su sitio de contacto (operador) y el gene es expresado constitutivamente.

Se observó el crecimiento de células transformadas con las diferentes construcciones en pUC18 durante 96 hrs de haber sido plaqueadas en el medio selectivo (0.2% glucosa + casaminoácidos 0.032% + 0.5mM de IPTG). Bajo esta condición, las colonias transformadas con pUC18 no fueron capaces de crecer, así como las construcciones formadas por los Dres. Horjales y Gloria Saab (figura 23). Esta condición también nos permitió diferenciar clonas que contenían construcciones con genes de TIM de diferentes actividades. En general, bajo esta condición las colonias son más grandes que las observadas en presencia de glucosa 0.2%+casaminoácidos 0.032%, debido a esto, esta condición fue empleada para seleccionar posteriormente las mutantes

más activas que monoTIM en los experimentos por evolución dirigida. La aparición de colonias de WT TIM se da desde las 12 hrs de haber sido inoculadas en las cajas de medio selectivo, mientras que la aparición de colonias con C14F se observa a las 20 hrs y las de monoTIM aparecen a las 40hrs.

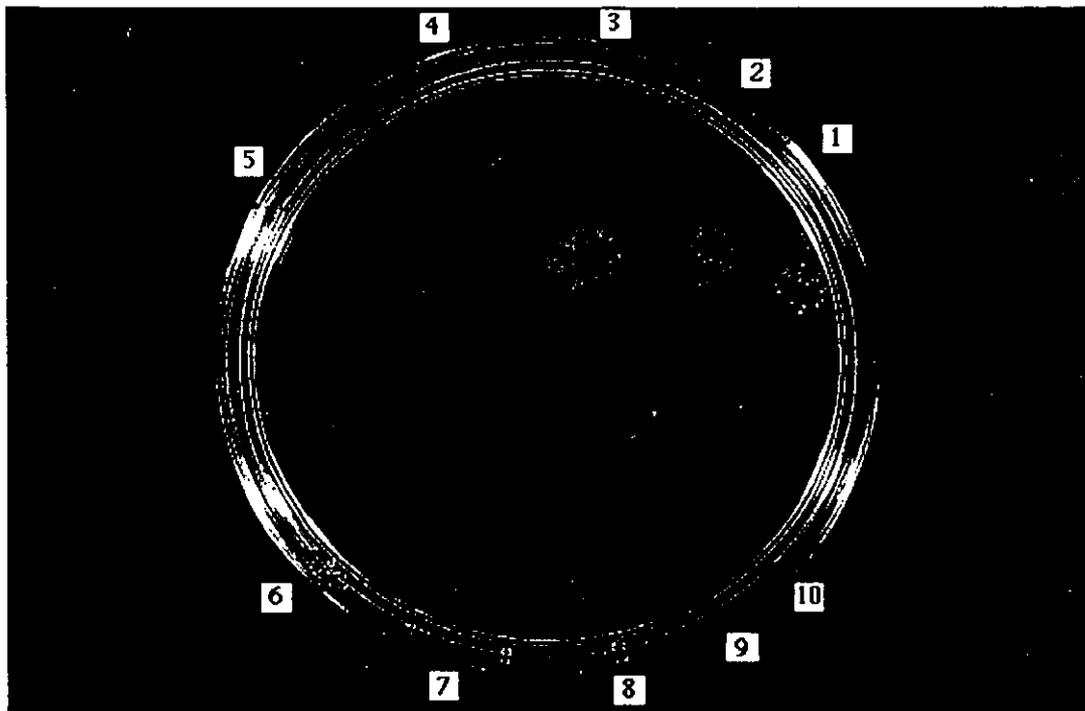


Figura 23. Variantes de TIM que muestran el intervalo dinámico de actividad en la condición de MM+glucosa 0.2% + casaminoácidos 0.032% + IPTG 0.5mM, por técnica de goteo. 1) pUC18 + monoTIM 1000 veces menos activa; 2) pUC18 + C14F 100 veces menos activa; 3) pUC18 + WT TIM; 4) pUC18; 5) pUC18 + mutante 2.1; 6) pUC18 + mutante 5.1; 7) pUC18 + mutante 13; 8) pUC18 + mutante 1; 9) pUC18 + mutante 2 y 10) pUC18 + mutante 5, crecimiento a las 48 hrs después de inocular las colonias e incubarlas a 37°C.

La condición de glucosa 0.2%+ 0.5mM de IPTG únicamente ayuda al crecimiento de las colonias de C14F y WT TIM, siendo de mayor tamaño las colonias que llevan la enzima WT TIM. Sin embargo, esta condición también fué empleada para seleccionar las mutantes más activas que la monoTIM en los experimentos de evolución dirigida, ya que es una condición más astringente que la mencionada con anterioridad.

Por otra parte, es importante mencionar que también se tienen condiciones de selección más estrictas donde solo son capaces de crecer colonias de la cepa VEJM101 transformada con pUC18+C14F y WT TIM, tal es el caso de la condición de MM+ 0.1% de glicerol donde las colonias de C14F son de menor tamaño que las colonias provenientes de WT TIM. En general

ambas colonias son de menor tamaño que las encontradas en la condición de 0.2% glucosa.

Como se mencionó anteriormente, al emplear el glicerol como única fuente de energía se forma la dihidroxiacetona fosfato. Este producto en ausencia de TIM no puede ser isomerizado a gliceraldehído-3 fosfato por lo que la dihidroxiacetona es transformada a metilglioxal, un compuesto citotóxico que al acumularse afecta la traducción, transcripción y replicación de las bacterias (Krymkiewiez et al., 1971). En la condición de 0.3% de glicerol sólo crecieron las colonias que presentan la enzima sin alteraciones (WT TIM), sin embargo, estas colonias son diminutas, mientras que el resto de las variantes de TIM no crecieron. La mayor concentración de glicerol tiene un mayor efecto de toxicidad para la bacteria.

Al utilizar un medio con glicerol al 0.3%, con casaminoácidos al 0.032% y 0.5 mM de IPTG, se obtuvo un incremento en el crecimiento de las colonias complementadas con el gene de la enzima WT TIM, ya que las colonias incrementan ligeramente su tamaño, esto nuevamente se puede atribuir a que el IPTG ayuda a desreprimir el sistema para que la polimerasa transcriba el gene de TIM, formándose mayor cantidad de proteína capaz de convertir la DHAP a GAP en un medio con glicerol. El resto de las variantes de TIM nuevamente no crecieron.

Los sistemas probados nos permitieron garantizar un rango de condiciones para discriminar entre mutantes poco activas y más activas.

En general, el resto de las combinaciones de glicerol con glucosa+casaminoácidos no generó información confiable, para poder emplear algunas de estas fuentes de carbono en experimentos de evolución dirigida. Ya que no se encontró una correlación entre la actividad de la enzima que complementa la actividad de TIM y el tamaño de las colonias, dichos sistemas no fueron empleados en los experimentos de evolución dirigida.

Con la finalidad de encontrar mutantes más activas que la monoTIM, se realizó mutagénesis al azar sobre el gene *tpi* de esta enzima, una vez comprobada la complementación en la cepa VEJM101 con diferentes variantes de TIM en medios selectivos.

### **6.7 Generación de proteínas más activas que monoTIM por evolución dirigida.**

Para la generación de proteínas más activas que la monoTIM fue necesario el empleo de la evolución dirigida por mutagénesis al azar en el gene de monoTIM (figura 24). Esta técnica se utilizó ya que ha dado grandes resultados en otros tipos de proteínas en donde ha sido posible la generación de proteínas con diferentes propiedades, por ejemplo: la formación de proteínas más activas a partir de la cual fueron formadas (Cramer et al., 1996; Taguchi et al., 1998; Zaccolo y Gherardi, 1999). Para poder detectar todas las posibles mutantes (sencillas, dobles y triples) a nivel de nucleótido es necesario que se construyan bancos de millones de variantes independientes.

requiere de ligaciones grandes (2 a 3  $\mu$ g de DNA vector), células con buena eficiencia de electrotransformación (XLIBLUE) y electroporaciones en volúmenes grandes (200  $\mu$ l de células y recuperación en 2 ml de SOC).

```

1                                      $\beta$ 1                                     20
ATG TCC AAG CCA CAA CCC ATC GCA GCA GCC AAC TGG AAG TGC AAC GGC TCC CAA CAG TCT
met ser lys pro gln pro ile ala ala ala asn trp lys cys asn gly ser gln gln ser

       $\alpha$ 1
TTC TCG GAG CTT ATT GAT CTG TTT AAC TCC ACA AGC ATC AAC CAC GAC GTC CAA TGC GTA
leu ser glu leu ile asp leu phe asn ser thr ser ile asn his asp val gln cys val

       $\beta$ 2 L o o p 2                                      $\alpha$ 2
GTG GCC TCC ACC TTT GTT CAC CTT GCC ATG ACG AAG GAG CGT CTT TCA CAC CCC AAA TTT
val ala ser thr phe val his leu ala met thr lys glu arg leu ser his pro lys phe
43 44

       $\beta$ 3                                      $\alpha$ 3
GTG ATT GCG GCG CAG AAC GCA GGT AAC GCT GAC GCT CTG GCT TCC CTC AAA GAT TTC GGT
val ile ala ala gln asn ala gly asn ala asp ala leu ala ser leu lys asp phe gly

       $\beta$ 4
GTC AAC TGG ATT GTT CTG GGT CAC TCC GAG CGC CGC GCA TAC TAT GGT GAG ACA AAC GAG
val asn trp ile val leu gly his ser glu arg arg ala tyr tyr gly glu thr asn glu

       $\alpha$ 4                                      $\beta$ 5
ATT GTT GCG GAC AAG GTT GCC GCC GCC GTT GCT TCT GGT TTC ATG GTT ATT GCT TGC ATC
ile val ala asp lys val ala ala ala val ala ser gly phe met val ile ala cys ile

                                      $\alpha$ 5
GGC GAA ACG CTG CAG GAG CGT GAA TCA GGT CGC ACC GCT GTT GTT GTG CTC ACA CAG ATC
gly glu thr leu gln glu arg glu ser gly arg thr ala val val val leu thr gln ile

                                      $\beta$ 6
GCT GCT ATT GCT AAG AAA CTG AAG AAG GCT GAC TGG GCC AAA GTT GTC ATC GCC TAC GAA
ala ala ile ala lys lys leu lys lys ala asp trp ala lys val val ile ala tyr glu

                                      $\alpha$ 6
CCC GTT TGG GCC ATT GGT ACC GGC AAG GTG GCG ACA CCA CAG CAA GCG CAG GAA GCC CAC
pro val trp ala ile gly thr gly lys val ala thr pro gln gln ala gln glu ala his

GCA CTC ATC CGC AGC TGG GTG AGC AGC AAG ATT GGA GCA GAT GTC GCG GGA GAG CTC CGC
ala leu ile arg ser trp val ser ser lys ile gly ala asp val ala gly glu leu arg

       $\beta$ 7                                      $\alpha$ 7
ATT CTT TAC GGC GGT TCT GTT AAT GGA AAG AAT GCG CGC ACT CTT TAC CAA CAG CGA GAC
ile leu tyr gly gly ser val asn gly lys asn ala arg thr leu tyr gln gln arg asp
208

       $\beta$ 8                                      $\alpha$ 8
GTC AAC GGC TTC CTT GTT GGT GGT GCC TCA CTT AAG CCA GAA TTT GTG GAC ATC ATC AAA
val asn gly phe leu val gly gly ala ser leu lys pro glu phe val asp ile ile lys

241      243
GCC ACT CAG TGA
ala thr gln OPA

```

Figura 24. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de monoTIM. Los elementos de estructura secundaria hebras  $\beta$  y  $\alpha$  hélices son marcados en color azul y verde respectivamente:

### 6.7.1 Mutagénesis al azar

Se realizaron 4 reacciones independientes de PCR mutagénica al azar sobre el gene de la monoTIM con la finalidad de generar variación en la secuencia, para posteriormente seleccionar las clonas más activas de monoTIM (figura 25). Las condiciones mutagénicas empleadas son las descritas por Cadwell y Joyce (1992), mencionadas en la metodología. La razón por la cual se utilizó esta estrategia, radica en que la tasa mutagénica es baja incorporando un número pequeño de mutaciones, entre 4 y 6 cambios a nivel de nucleótido para un gene de 763 pb (el tamaño del gene *tpi* de monoTIM en *T. brucei*), comparadas con otros protocolos de PCR mutagénicas que introducen de 15 a 20 cambios en un gene de este tamaño (763pb), estas PCRs mutagénicas emplean agentes como el DMSO (Dimetil sulfoxido) y  $\beta$ -mercaptoetanol que provocan que la polimerasa introduzca mutaciones con mayor frecuencia.

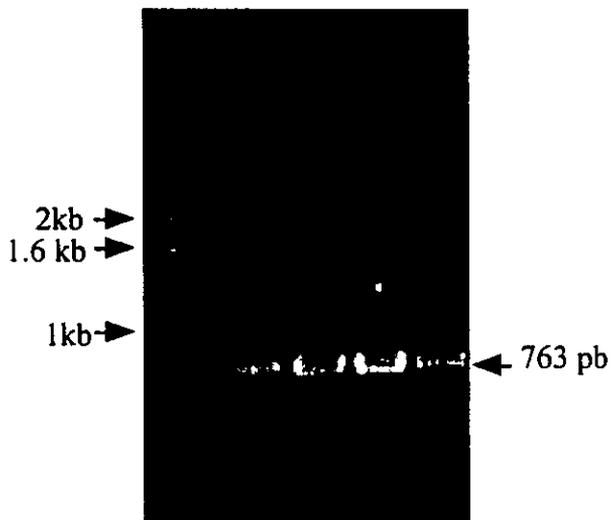


Figura 25. Productos de 763 pb formados por PCRs mutagénicas independientes del gene de la monoTIM en los carriles 2 al 5. En el carril 1 esta el marcador de peso molecular de 1 Kb.

### 6.7.2 Selección de las proteínas más activas que monoTIM y análisis del PCR diagnóstico

Se realizaron dos tipos de selección empleando como única fuente de carbono glucosa al 0.2% + 0.5 mM de IPTG con 0.032% de casaminoácidos y sin casaminoácidos. En el caso de la selección sin casaminoácidos en las cajas Petri, se observaron decenas de colonias pequeñas sobre

las cuales destacaron unas cuantas colonias de mayor tamaño. De estas se tomaron 3 colonias al azar (colonias 1, 2 y 3), las cuales constituyeron el grupo a). Para el caso de la selección en medio mínimo suplementado con 0.032% de casaminoácidos + 0.5 mM de IPTG, en las cajas se observaron cientos de colonias pequeñas sobre las cuales destacaron colonias de mayor tamaño. Se tomaron 3 de estas colonias al azar, las cuales formaron el grupo b) colonias 4, 5 y 6. Se inocularon con el mismo número de células mezcladas por un lado las del grupo a) y por el otro las del grupo b), en matraces que contienen: glucosa 0.2% + IPTG 0.5 mM con casaminoácidos y matraces con glucosa 0.2% + IPTG 0.5 mM sin casaminoácidos. Las clonas 1, 2 y 3 crecieron más rápido que los matraces que contenían las clonas 4, 5 y 6; tanto en presencia de casaminoácidos como en ausencia de los mismos. Todos estos inóculos crecieron más rápido que aquellos que contenían células complementadas con el gene de monoTIM.

Posteriormente las colonias de ambos grupos fueron cultivadas individualmente en medio Luria + Km + Amp. Se purificaron los plásmidos utilizando el kit para purificación de plásmidos de Boehringer (High Pure™ Plasmid Isolation Kit) y se digirieron con EcoRI y HindIII. Todas las clonas liberaron el producto equivalente al gene de monoTIM. Fué necesario utilizar un oligo que reconoce únicamente la secuencia del asa 3 de la enzima dimérica, para excluir por PCR la ausencia de contaminación en el banco proveniente de la secuencia dimérica. Al realizar esta PCR diagnóstico con un oligo que reconoce la secuencia que codifica el asa 3 presente en el dímero y el oligo EcoRI (40 amero), reconoce el inicio del gene, se forma un producto de 250 pb sólo cuando la secuencia contiene el asa 3 del dímero, el resultado fué que del grupo a), sólo la clona 1 es una enzima monomérica ya que no liberó producto en la reacción de PCR, mientras que el resto de las clonas resultaron ser dímeros, debido a que liberaron el producto de 250 pb (figura 26). Esta clonal fue denominada clona E. Mientras que ninguna de las 3 clonas seleccionadas del grupo b), mostraron reacción de PCR, por lo tanto contienen enzimas monoméricas (figura 26). Se realizó una reclonación en pUC18 de los insertos combinados de este grupo y se llevó a cabo una retransformación en la cepa VEJM101 (transformación a baja escala). Nuevamente se seleccionaron en presencia de glucosa 0.2% + 0.5 mM de IPTG + casaminoácidos. El resultado fué la selección de una colonia de mayor tamaño que el observado para monoTIM. Se creció en medio Luria y se purificó el plásmido. Esta clona que fué capaz de crecer en presencia de casaminoácidos, posteriormente fué completamente secuenciada, reclonada en la cepa VEJM101 (transformación a baja escala), nuevamente secuenciada y probada para determinar su fenotipo en el medio selectivo. A esta clona se le denominó clona V. La clona E que fué capaz de crecer en ausencia de casaminoácidos, posteriormente fué completamente secuenciada y reclonada en la cepa

VEJM101 (transformación a baja escala), nuevamente secuenciada y probada para determinar su fenotipo en el medio selectivo.

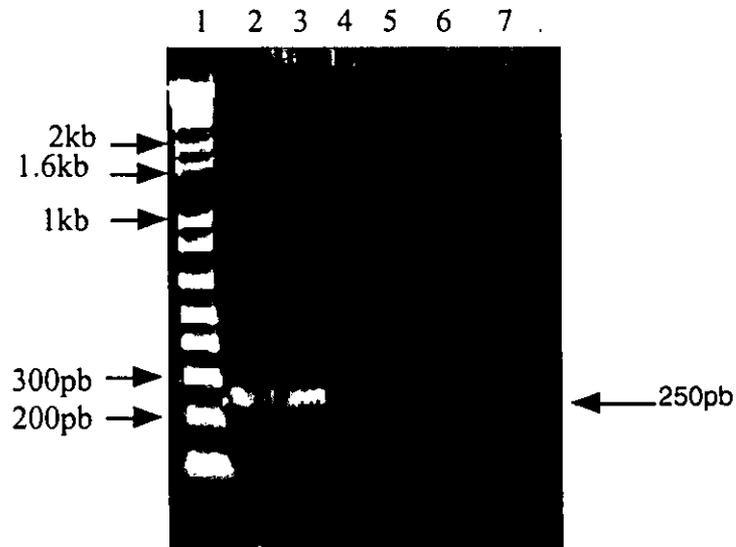


Figura 26. PCR diagnóstico del asa 3. Carril 1, marcador de peso molecular 1kb plus de Gibco; carriles 2 y 3 corresponden a las colonias 2 y 3 diméricas; carril 4 al 7 corresponden a las colonias 1, 4, 5 y 6 monoméricas que no amplifican el producto de 250pb.

## 6.8 Análisis de secuencia de las mutantes seleccionadas.

El análisis de la secuencia de la clona E seleccionada de la condición sin casaminoácidos, mostró la presencia de proteína derivada de la monoTIM, con tres cambios de aminoácidos en las siguientes posiciones: S43P, T44A y A179T (figura 27).

```

1                               β1                               20
ATG TCC AAG CCA CAA CCC ATC GCA GCA GCC AAC TGG AAG TGC AAC GGC TCC CAA CAG TCT
met ser lys pro gln pro ile ala ala ala asn trp lys cys asn gly ser gln gln ser

α1
TTG TCG GAG CTT ATT GAT CTG TTT AAC TCC ACA AGC ATC AAC CAC GAC GTC CAA TGC GTA
leu ser glu leu ile asp leu phe asn ser thr ser ile asn his asp val gln cys val

β2 L o o p 2                               α2
GTG GCC CCG GGC TTT GTT CAC CTT GCC ATG ACG AAG GAG CGT CTT TCA CAC CCC AAA TTT
val ala pro ala phe val his leu ala met thr lys glu arg leu ser his pro lys phe
43 44

β3                               α3
GTG ATT GCG GCG CAG AAC GCA GGT AAC GCT GAC GCT CTG GCT TCC CTC AAA GAT TTC GGT
val ile ala ala gln asn ala gly asn ala asp ala leu ala ser leu lys asp phe gly

β4
GTC AAC TGG ATT GTT CTG GGT CAC TCC GAG CGA CGC GCA TAC TAT GGT GAG ACA AAC GAG
val asn trp ile val leu gly his ser glu arg arg ala tyr tyr gly glu thr asn glu

α4                               β5
ATT GTT GCG GAC AAG GTT GCC GCC GCC GTT GCT TCT GGT TTC ATG GTT ATT GCT TGC ATC
ile val ala asp lys val ala ala ala val ala ser gly phe met val ile ala cys ile

α5
GGC GAA ACG CTG CAG GAG CGT GAA TCA GGT CGC ACC GCT GTT GTT GTG CTC ACA CAG ATC
gly glu thr leu gln glu arg glu ser gly arg thr ala val val val leu thr gln ile

β6
GCT GCT ATT GCT AAG AAA CTG AAG AAG GCT GAC TGG GCC AAA GTT GTC ATC GCC TAC GAA
ala ala ile ala lys lys leu lys lys ala asp trp ala lys val val ile ala tyr glu

α6
CCC GTT TGG GCC ATT GGT ACC GGC AAG GTG GCG ACA CCA CAG CAA GCG CAG GAA ACC CAC
pro val trp ala ile gly thr gly lys val ala thr pro gln gln ala gln glu thr his
179

GCA CTC ATC CGC AGC TGG GTG AGC AGC AAG ATT GGA GCA GAT GTC GCG GGA GAG CTC CGC
ala leu ile arg ser trp val ser ser lys ile gly ala asp val ala gly glu leu arg

β7                               α7
ATT CTT TAC GGC GGT TCT GTT ATT GGA AAG AAT GCG CGC ACT CTT TAC CAA CAG CGA GAC
ile leu tyr gly gly ser val asn gly lys asn ala arg thr leu tyr gln gln arg asp

β8                               α8
GTC AAC GGC TTC CTT GTT GGT GGT GCC TCA CTT AAG CCA GAA TTT GTG GAC ATC ATC AAA
val asn gly phe leu val gly gly ala ser leu lys pro glu phe val asp ile ile lys
241 243
GCC ACT CAG TGA
ala thr gln OPA

```

Figura 27. Secuencia de la clona E monomérica más activa. Las mutaciones que cambian el aminoácido se muestran en rojo (S43P, T44A y A179T).

Para el caso de la clona V seleccionada de la condición con casaminoácidos proveniente del grupo b) 4, 5 y 6. El análisis de la secuencia mostró la presencia de otra proteína derivada de la monoTIM, con 3 mutaciones a nivel de aminoácido en las siguientes posiciones: S43P, T44S y N208S (figura 28).

```

1          β1          20
ATG TCC AAG CCA CAA CCC ATC GCA GCA GCC AAC TGG AAG TGC AAC GGC TCC CAA CAG TCT
met ser lys pro gln pro ile ala ala ala asn trp lys cys asn gly ser gln gln ser

      α1
TTG TCG GAG CTT ATT GAT CTG TTT AAC TCC ACA AGC ATC AAC CAC GAC GTC CAA TGC GTA
leu ser glu leu ile asp leu phe asn ser thr ser ile asn his asp val gln cys val

      β2 L o o p 2          α2
GTG GCC CCC AGC TTT GTT CAC CTT GCC ATG ACG AAG GAG CGT CTT TCA CAC CCC AAA TTT
val ala pro ser phe val his leu ala met thr lys glu arg leu ser his pro lys phe
43 44

      β3          α3
GTG ATT GCG GCG CAG AAC GCA GGT AAC GCT GAC GCT CTG GCT TCC CTC AAA GAT TTC GGT
val ile ala ala gln asn ala gly asn ala asp ala leu ala ser leu lys asp phe gly

      β4
GTC AAC TGG ATT GTT CTG GGT CAC TCC GAG CGA CGC GCA TAC TAT GGT GAG ACA AAC GAG
val asn trp ile val leu gly his ser glu arg arg ala tyr tyr gly glu thr asn glu

      α4          β5
ATT GTT GCG GAC AAG GTT GCC GCC GCC GTT GCT TCT GGT TTC ATG GTT ATT GCT TGC ATC
ile val ala asp lys val ala ala ala val ala ser gly phe met val ile ala cys ile

          α5
GGC GAA ACG CTG CAG GAG CGT GAA TCA GGT CGC ACC GCT GTT GTT GTG CTC ACA CAG ATC
gly glu thr leu gln glu arg glu ser gly arg thr ala val val val leu thr gln ile

      β6
GCT GCT ATT GCT AAG AAA CTG AAG AAG GCT GAC TGG GCC AAA GTT GTC ATC GCC TAC GAA
ala ala ile ala lys lys leu lys lys ala asp trp ala lys val val ile ala tyr glu

          α6
CCC GTT TGG GCC ATT GGT ACC GGC AAG GTG GCG ACA CCA CAG CAA GCG CAG GAA GCC CAC
pro val trp ala ile gly thr gly lys val ala thr pro gln gln ala gln glu ala his

GCA CTC ATC CGC AGC TGG GTG AGC AGC AAG ATT GGA GCA GAT GTC GCG GGA GAG CTC CGC
ala leu ile arg ser trp val ser ser lys ile gly ala asp val ala gly glu leu arg

      β7          α7
ATT CTT TAC GGC GGT TCT GTT AGT GGA AAG AAT GCG CGC ACT CTT TAC CAA CAG CGA GAC
ile leu tyr gly gly ser val ser gly lys asn ala arg thr leu tyr gln gln arg asp
208

      β8          α8
GTC AAC GGC TTC CTT GTT GGT GGT GCC TCA CTT AAG CCA GAA TTT GTG GAC ATC ATC AAA
val asn gly phe leu val gly gly ala ser leu lys pro glu phe val asp ile ile lys

241      243
GCC ACT CAG TGA
ala thr gln OPA

```

Figura 28. Secuencia de la clona V derivada de la combinación de las clonas 4, 5 y 6 monoméricas. Las mutaciones que cambian el aminoácido se muestran en rojo (S43P, T44S y N208S).

## 6.9 Tasa mutagénica

Se secuenciaron 5 colonias al azar provenientes del banco inicial (cepa XLIBLUE) del medio LB+Km+Amp. Este análisis de secuencia reveló la presencia de 15 mutaciones a nivel de nucleótidos. Las mutaciones caen al azar a lo largo de la secuencia de la monoTIM. La distribución de estas mutaciones a nivel de nucleótidos fué la siguiente: una doble mutante, 3 triples mutantes y una mutante cuádruple; con esto se determinó la tasa real de mutagenicidad de 0.41% comparada con el valor esperado para la estrategia utilizada de 0.66% según Cadwell y Joyce (1992). Todas las mutantes que se seleccionaron para este análisis correspondían a la secuencia del monómero, es decir no contenían el asa 3 originalmente presente en la enzima dimérica.

## 6.10 Análisis de los experimentos de complementación de la cepa VEJM101 transformada con las diferentes variantes del gene *tpi* obtenidas en medio selectivo sin casaminoácidos y en medio LB.

Para llevar a cabo los experimentos de complementación de las diferentes variantes de TIM en la cepa VEJM101 fué necesario una retransformación de todas las construcciones. Con la finalidad de emplear colonias frescas, se estriaron por triplicado en cajas con medio mínimo suplementado con Glucosa 0.2%+0.5 mM de IPTG y en medio LB. Los resultados reflejan que la construcción que complementa en menor tiempo a la cepa VEJM101 es la proveniente de WT TIM en pUC18, seguida por la mutante sencilla C14F del Dr. Ruy Pérez y las mutantes triples monoméricas seleccionadas, aunque las colonias de la mutante V (S43P, T44S y N208S), son de menor tamaño que las colonias de la mutante E (S43P, T44S, A179T). No aparecen colonias complementadas con monoTIM+pUC18 (a las 96 hrs de haber estriado las cajas), ni colonias con pUC18. Es claro que las mutantes monoméricas obtenidas tienen una actividad mayor que monoTIM, ya que fueron capaces de crecer un medio estricto (MM+glucosa+IPTG), condición en la cual no se había logrado obtener crecimiento con enzima monomérica. La mutante E (S43P, T44S, A179T), es 100 veces menos activa que la WT TIM (Datos obtenidos por la Dr. Saab en experimentos posteriores); ésta es la razón por la cual la mutante E fué capaz de complementar la cepa VEJM101, al igual que la mutante C14F que también es 100 veces menos activa que la enzima WT TIM (figura 29). Actualmente se está cristalizando la proteína, para poder conocer como contribuyen las mutaciones en la estructura de la proteína. Por otra parte, no se han determinado los parámetros cinéticos de la mutante V (S43P, T44S y N208S), pero estos serán mas bajos que los de la mutante E, tomando en cuenta la tasa de crecimiento de la cepa VEJM101 complementada con este gene.

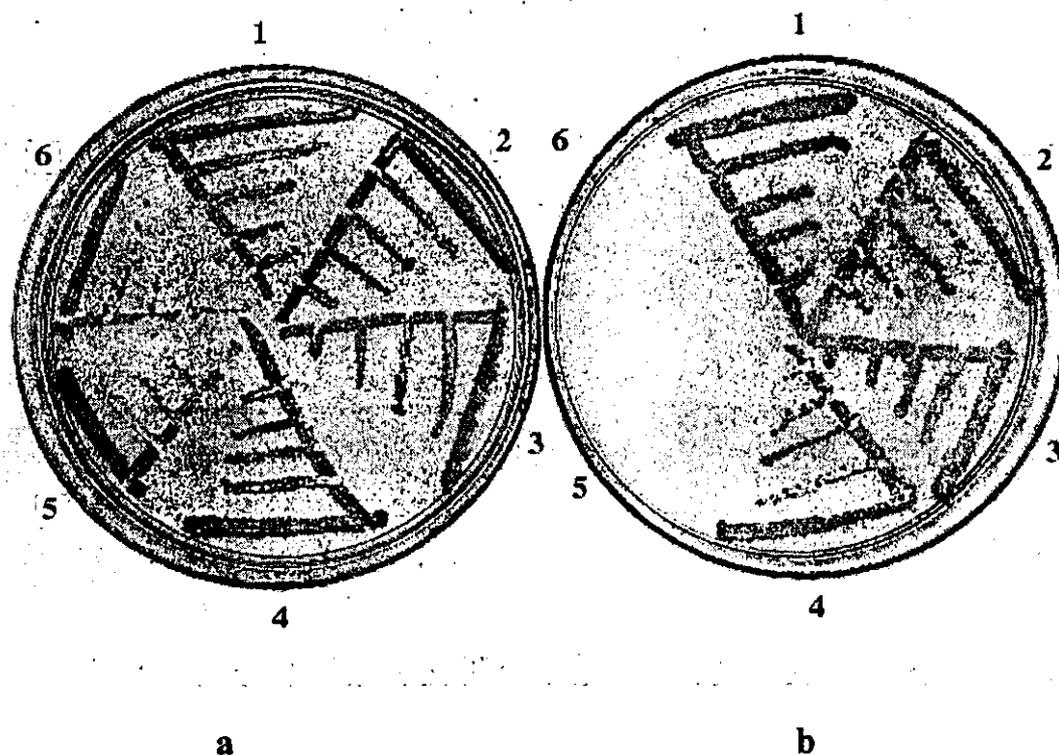


Figura 29. Crecimiento de la cepa VEJM101 con diferentes variantes de TIM en los medios: a) LB y b) medio mínimo con Glucosa 0.2%+0.5 mM de IPTG. a las 48 hrs de haber estriado las colonias y a 37°C. 1, WT TIM; 2, mutante E; 3, C14F; 4, mutante V; 5, monoTIM y 6, pUC18.

### 6.11 Cinéticas de crecimiento

Se estudió la cinética de crecimiento de la cepa VEJM101 complementada con las dos mutantes, con monoTIM así como con el pUC18 solo. También se estudió la cinética de crecimiento de la cepa JM101 sólo y con el plásmido pUC18.

Las cinéticas de crecimiento en la figura 30 cubren 15 hrs de crecimiento en medio mínimo con glucosa 0.2% + IPTG 0.5 mM. La cepa JM101 mostró la mayor velocidad de crecimiento celular en el medio selectivo debido a que tiene su genoma intacto. Sin embargo, cuando la misma cepa es transformada con el plásmido pUC18 muestra un retraso en la velocidad de crecimiento (figura 30). No obstante, la cepa llega a la saturación del cultivo, el retraso se debe a la presencia selectiva del antibiótico, por lo que la cepa tiene una carga metabólica extra para evitar la acción del antibiótico.

La mutante triple (S43P, T44A y A179T), seleccionada bajo la condición de glucosa 0.2% + IPTG 0.5 mM dispara su velocidad de crecimiento a las 7 horas de haber sido inoculada,

consistentemente con lo que ya se había observado en caja con medio selectivo. La otra mutante triple (S43P, T44S y N208S), seleccionada de glucosa 0.2% + IPTG 0.5 mM + casaminoácidos muestra su disparo en la velocidad de crecimiento a las 9 horas de haber sido inoculada, sin embargo, esta mutante crece más lento que la mutante proveniente de la selección en medio mínimo sin casaminoácidos, si bien es cierto que crece más rápido que la cepa complementada con el gene de la monoTIM. Es relevante comentar que esta mutante es capaz de crecer en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono e IPTG tanto en medio líquido como en medio sólido.

Desafortunadamente, tanto WT TIM como la mutante C14F (datos no mostrados), crecieron muy poco, aparentemente el problema fué que los inóculos utilizados para estas dos construcciones en particular, provenían de células almacenadas a -70°C en glicerol al 20%, el glicerol es tóxico para la cepa *tpi-*, a pesar de que se hizo un preinóculo nocturno en LB los cultivos no llegaron a saturación como se esperaba. Estos experimentos fueron repetidos y validados posteriormente por la Dr. Saab donde se mostró que tanto la WT TIM como la C14F crecen mejor que las mutantes monoméricas, sin embargo, ambas mutantes crecen mucho mejor que la monoTIM.

La C14F fue una mutante generosamente obsequiada por el Dr. Ruy Pérez Monfort, la cual ya se encontraba caracterizada cinéticamente, cuya *k<sub>cat</sub>* había disminuido 100 veces con respecto a WT TIM, por lo que se utilizó para validar el intervalo dinámico de selección de nuestra cepa.

Para el caso de la complementación con la monoTIM, la clona resultante crece muy poco y lentamente en el medio líquido selectivo (glucosa + IPTG), esto también es consistente con los datos encontrados en cajas con medio selectivo donde dicha enzima es incapaz de complementar a la cepa VEJM101. Para el caso de la cepa VEJM101 complementada con el plásmido pUC18 no se observó crecimiento, esto correlaciona con los datos encontrados en las cajas con medio mínimo donde no hay colonias después de más de 96 hrs de incubación.

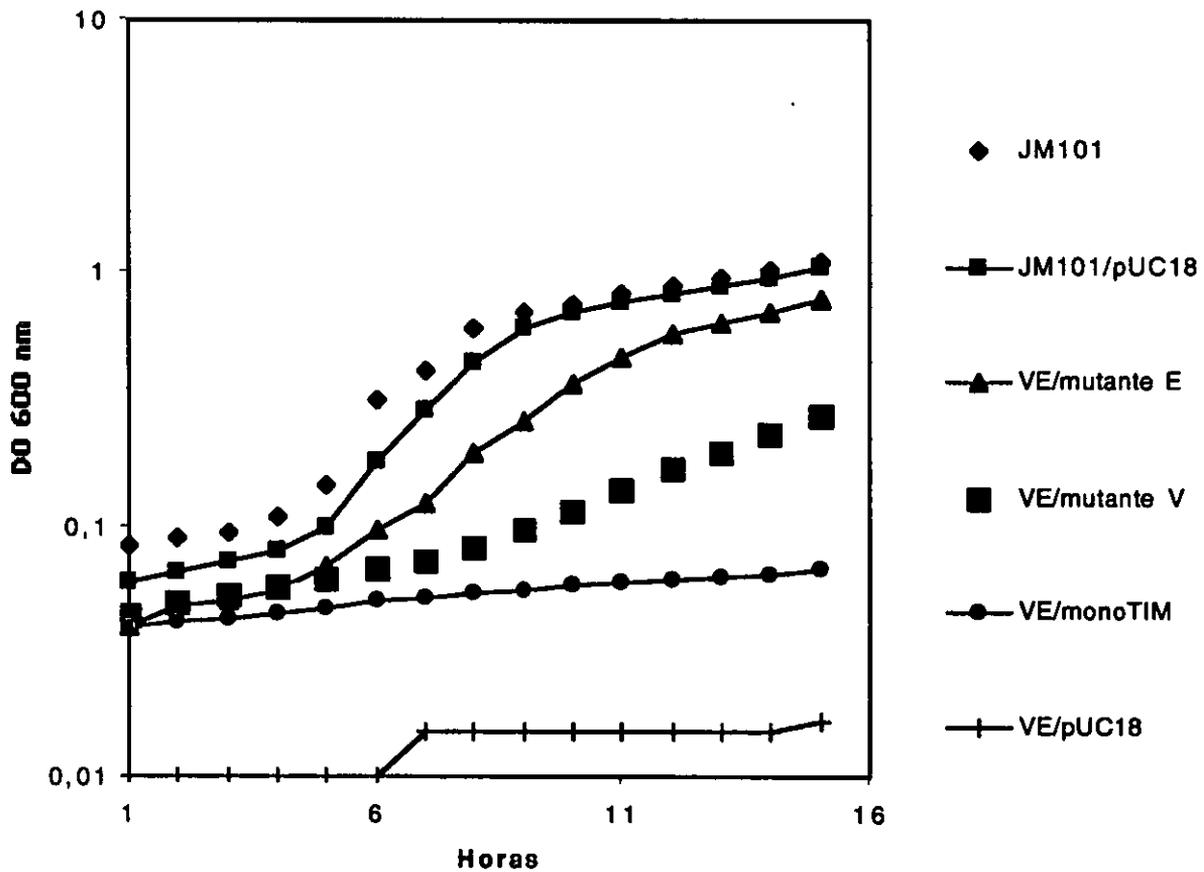


Figura 30. Cinéticas de crecimiento de las mutantes más activas que monoTIM, comparadas con diferentes variantes de TIM.

## VI. DISCUSION

Se diseñó una cepa *tpi*- (VEJM101) de *Escherichia coli* que fue útil para la selección de variantes con diferentes niveles de actividad de triosafosfato isomerasa. Dicha cepa fué generada mediante un evento de doble recombinación, para lo cual se empleó el plásmido sensible a temperatura (pMAK705) y un fragmento homólogo al genoma de *E. coli* de 4.3 Kb. En esta secuencia genómica, el gene *tpi* fué situado en el centro para posteriormente ser interrumpido mediante la inserción del cassette que contiene la unidad de transcripción del gene *nptII* cuyo producto proteico confiere resistencia a kanamicina.

La cepa VEJM101 nos permite analizar un amplio intervalo dinámico por medio del cual se pueden rastrear mutantes con actividades de triosafosfato isomerasa que van del orden de 100 hasta 1000 veces menos activas que la enzima silvestre de *Trypanosoma brucei*. Esto no fue posible en nuestras manos con las otras cepas *tpi*- reportadas en la literatura. Con glucosa al 0.2% como única fuente de carbono, la cepa VEJM101 es capaz de ser complementada con los vectores pET3a que llevan el gene de la monoTIM y WT TIM observándose una diferencia dramática en el tamaño de las colonias, siendo las colonias que contienen el gene de WT TIM más grandes que las colonias que contienen el gene de monoTIM. Aunque el pET3a es un vector que contiene un promotor fuerte del fago T7 (no reconocido por la polimerasa endógena de la VEJM101), pudimos observar la complementación. La cepa BL21 de *E. coli* si puede iniciar transcripción a partir de este promotor, debido a que presenta la RNA polimerasa del fago T7.

La cepa VEJM101, en presencia de glicerol al 0.2% como única fuente de carbono no fue capaz de crecer a menos que fuera complementada con la enzima TIM dimérica de *T. brucei* (BiTIM). Dado que las colonias son de menor tamaño a las encontradas con glucosa + IPTG, se puede inferir que para evitar el envenenamiento por metilglioxal, la cepa VEJM101 necesita ser complementada por un gene que tenga una TIM funcional. Aunque pudiera pensarse que completaciones heterólogas serían menos eficientes, la cepa es capaz de crecer en un medio totalmente adverso (MM+glicerol), en el que el metilglioxal se concentraría a menos que se encontrara una proteína TIM muy activa.

Cuando la cepa AA200 fué transformada con la construcción pET3a+WT TIM o BiTIM (enzima dimérica de *T. brucei*) y crecida bajo la condición de glicerol 0.2%, ésta no fué capaz de complementar como en el caso anterior. Esto pudiera explicarse asumiendo que la AA200 presenta alteraciones en otras secuencias génicas o regulatorias y esto de alguna manera resulta lógico considerando que la mutante no ha sido bien caracterizada.

En el análisis de los experimentos de complementación en 0.2% de glucosa y 0.2% de glicerol, la cepa VEJM101 fue complementada usando diferentes plásmidos y aunque se obtuvieron resultados muy alentadores, fue necesario hacer estos mismos experimentos con mayor número de condiciones para selección de actividad de TIM y empleando un mayor número de variantes de TIM clonadas en un mismo vector (pUC18), con la finalidad de que los genes fueran expresados con la RNA polimerasa bacteriana de la JM101. De tal forma que tuviéramos nuestro sistema de selección montado bajo un mismo fondo genético.

La utilización de glucosa al 0.2% como única fuente de carbono + IPTG 0.5 mM, nos permite la complementación de la cepa VEJM101 con el plásmido pUC18 que lleva la mutante C14F (100 veces menos activa) y el plásmido con WT TIM, observándose diferencias en el tiempo de aparición de las colonias y el tamaño de las mismas. Mientras que al usar 0.2% de glucosa + 0.032% de casaminoácidos + IPTG 0.5 mM, nos permitió aumentar el intervalo dinámico de selección de actividad menor de isomerasa, permitiéndonos la formación de colonias con pUC18+monoTIM (1000 veces menos activa), así como pUC18+C14F (100 veces menos activa) y WT TIM (TIM silvestre de *T. brucei*). De igual modo, la condición de 0.2% de glucosa + casaminoácidos nos permitió ver la aparición de las mismas complementaciones, sólo que con una tasa de crecimiento menor en general.

El uso de diferentes condiciones de medio mínimo permitió la discriminación de diferentes órdenes de magnitud de actividad de triosafosfato isomerasa en la cepa VEJM101. Además la cepa VEJM101 tiene una buena eficiencia de electroporación ( $1 \times 10^8$  células/ $\mu\text{g}$  DNA), lo que nos permitió la formación y amplificación de bancos de TIM formados a partir de evolución dirigida por mutagénesis al azar.

Las condiciones que fueron empleadas para la selección de mutantes más activas que monoTIM son: glucosa 0.2%+ IPTG 0.5 mM sin casaminoácidos y glucosa 0.2%+ IPTG 0.5 mM con 0.032% de casaminoácidos. En ambas condiciones se encontraron mutantes más activas que la monoTIM que les dió origen. Para obtener dos mutantes más activas que la monoTIM por evolución dirigida, fueron necesarios los siguientes pasos: La formación de bancos genéticos de variación grandes. En este caso, obtuvimos un banco de  $5 \times 10^6$  transformantes, utilizando cepas con alta eficiencia de electrotransformación (XLIBLUE), ligaciones grandes, empleando 1 picomol de vector + 8 picomoles de inserto, volúmenes de electroporación mayores (200  $\mu\text{l}$  de células y 2 ml de medio SOC), una tasa de mutación baja (0.66%) y una cepa que tenga un intervalo dinámico en

medio selectivo o medios selectivos.

La ventaja de utilizar una tasa de mutagenicidad baja es que se evita la acumulación de mutaciones deletéreas para la actividad que impedirían la posterior selección de mutaciones benéficas para la función.

Hasta el momento, contamos con 2 mutantes triples derivadas de monoTIM que complementan más eficientemente que monoTIM la función de isomerizar los azúcares en la cepa VEJM101. La mutante triple seleccionada a partir de glucosa con IPTG, es capaz de crecer mejor, tanto en medio líquido como en medio sólido selectivo, que la otra mutante seleccionada con casaminoácidos. El análisis de la secuencia de ambas mutantes vino a reflejar los siguientes cambios, la mutante E proveniente del medio selectivo sin casaminoácidos presenta las mutaciones en los siguientes sitios: S43P, T44A y A179T, mientras que la mutante V proveniente del medio selectivo con casaminoácidos presenta las siguientes mutaciones: S43P, T44S y N208S.

Es interesante notar que ambas mutantes comparten cambios en las posiciones 43 y 44. La posición 43 en ambas clonas fué mutada de serina a prolina, mientras que la posición 44 de treonina fué cambiada a serina en una mutante y a alanina en la otra mutante. Al analizar cuidadosamente la secuencia de aminoácidos de las variantes monoméricas y su ubicación en la estructura tridimensional de monoTIM, se puede observar que dos de las mutaciones caen al principio del asa 2 (al final de la beta 2 y en el inicio del asa 2) (figura 31). Hay que recordar que en general, la prolina es un residuo que reduce la flexibilidad por lo que en este caso puede estar ayudando a rigidizar el asa 2. Esto es de gran relevancia debido a que esta asa 2 es posicionado del tal forma que evita que el asa 1 se mueva. En el asa 1 está la Lys 13 la cual es clave para el posicionamiento de los residuos catalíticos de la proteína.

El asa 1, el cual es bastante flexible en la estructura cristalina de la proteína monomérica debe interaccionar con su contigua asa 2. Es posible que al rigidizar el asa 2 mediante la mutación a prolina del residuo 43, se rigidice también el asa 1. Resulta claro de ambas mutantes que al mutar la posición 43 a prolina, la posición 44 tiene que ser modificada también, aparentemente la única restricción es que se mute a un residuo más pequeño que treonina (thr), como son alanina (Ala) o serina (Ser).

La presencia de mutaciones en las posiciones 43 y 44 en ambas mutantes nos lleva a pensar que son estas mutaciones las que son de relevancia para la actividad, más que la tercera posición mutada. En cada caso, esto tendría que ser corroborado construyendo las mutantes individuales.

La posición 179 que mutó de Alanina a Treonina en la mutante más activa o que crece mejor, cae en la mitad de la hélice-6, región en la cual se encuentra muy probablemente formando

puentes de hidrógeno con otros residuos aledaños. La mutación a treonina introduce un OH que incrementa las posibilidades de formación de puentes de hidrógeno contribuyendo potencialmente a la estabilidad de la proteína. En el caso de la mutante menos activa, la tercera mutación cae en el residuo 208 de Asparagina a Serina. Esta posición que se encuentra en el asa  $\beta/\alpha 7$ , podría tener una contribución en la actividad puesto que está más cercana al sitio activo. Sin embargo, es menos activa que la otra mutante triple, al menos de acuerdo a la tasa de crecimiento de la cepa VEJM101 (*tpi*-), complementada.

Una de las hipótesis anteriores a este trabajo generada por los investigadores Soberón y Saab era que la baja de funcionalidad de monoTIM se debía en gran medida a la entropía adquirida en la zona de los loops al remover el asa 3. Especialmente el asa 1, el cual ya no es visible en la estructura cristalizada de monoTIM (Borchert et al., 1993 y Borchert et al., 1994). Este loop es importante ya que contiene a la Lys 13, la cual al formar un puente salino con el glutámico 97 posiciona al residuo catalítico, His 95. La energía que ahora se tiene que emplear o invertir en monoTIM para mantener a estos residuos en el sitio catalítico, dan lugar a un aumento en la energía de activación para la reacción y por tanto una disminución en la *k<sub>cat</sub>*. Saab y Horjales propusieron un modelo mediante el cual se generara una monoTIM con una inserción de la secuencia correspondiente al asa 3 de la enzima dimérica en el asa 2, con la finalidad de hacer una tapa y evitar el desorden del asa 1. El hecho de encontrar coincidentemente que las dos mutantes más activas que monoTIM tienen cambios en el asa 2, apoya la hipótesis original de que logrando fijar las asas catalíticas, se podrá mejorar la actividad de la enzima monomérica.

Cuando se analiza el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las dos mutantes monoméricas más activas, la monoTIM y el dímero de *Trypanosoma brucei*, con las enzimas TIM diméricas de diferentes organismos reportadas en la base de datos, se puede observar un importante hallazgo, el cual radica en que la mutación de prolina en la posición 43 encontrada en las dos mutantes, se conserva en las TIM diméricas alineadas, el alineamiento incluye 35 secuencias de 50 conocidas (figura 31). Este residuo no está presente en la TIM dimérica de *T. brucei*, esto es muy interesante ya que al parecer las mutaciones que fueron seleccionadas para formar enzimas monoméricas más activas de *T. brucei* ya han sido seleccionadas y fijadas por la evolución en las TIM diméricas de otros organismos, incluso en las TIM de los tripanosomátidos como son: *Trypanosoma cruzi* (Ostoa-Saloma et al, 1997) y *Leishmania mexicana* (Kohl et al, 1994) que también presentan prolina en dicha posición. Esto sugiere que al monomerizar estas proteínas muy probablemente serían más activas que la monomerizada a partir de *Trypanosoma brucei* (Swinkels

et al., 1986). Esta mutación está representada en toda la gama de organismos, incluyendo vertebrados, invertebrados, plantas, hongos y bacterias. En el caso de los vertebrados, tanto el humano (Maquat et al, 1985), el mono Rhesus (Old y Mohrenweiser, 1988), el ratón (Cheng et al, 1990), el gallo (AAA49094), el conejo *Oryctolagus cuniculus* (Corran y Waley, 1975); el pez *Latimeria chalumnae* o Celacanto (Kolb et al, 1974) en invertebrados como: el gusano *Caenorhabditis elegans* (CAA19447); la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Shaw-Lee et al, 1991) y *Drosophila simulans* (Hasson et al, 1998), en parásitos como: *Plasmodium falciparum* (2624736), *Giardia lamblia* (Mowatt et al, 1994), en plantas como: el arroz *Oryza sativa* (Xu y Hall, 1993); el maíz (Marchionni y Gilbert, 1986) y *Arabidopsis thaliana* (P48491), en hongos como: *Coprinus cinereus* Basidiomyceto (Logsdon et al, 1995); *Aspergillus nidulans* Ascomyceto (Mcknight et al, 1986); *Sacharomyces cerevisiae* (Albert y Kawasaki, 1982), *Schizosaccharomyces pombe* (Russell, 1985), en bacterias como: *Escherichia coli* (Pichersky et al, 1984), *Enterobacter cloacae* (AAD16183); *Haemophilus influenzae* (664085), *Vibrio marinus* (Alvarez et al, 1998), *Pseudomonas syringae* (Rich y Willis, 1997), *Bacillus megaterium* (JQ1955), *Bacillus subtilis* (Leyva-Vazquez y Setlow, 1994), *Lactococcus lactis* (Cancilla et al, 1995), *Clostridium acetobutylicum* (AAC13162), *Borrelia burgdorferi* (Q59182), *Synechocystis* (Kaneko et al, 1995); *Mycobacterium leprae* (Smith y Robinson, 1994), *Hantobacter flavus* (AAC45452), *Brucella abortus* (Sangari et al, 1996). La prolina también esta presente en las bacterias termófilas como *Bacillus stearothermophilus* (Artavanis-Tsakonas y Harris, 1980). Con todo lo anterior se puede pensar que una de las mutaciones encontradas, como lo es Pro en la posición 43, en las dos variantes monoméricas más activas que la monoTIM que fué introducida por evolución dirigida está representada o ya fue seleccionada de manera natural en las TIM diméricas encontradas en los otros Tripanosomátidos y en un amplio espectro de organismos. Tan importante es este cambio que en la TIM tetramérica también esta presente la prolina en la misma posición, tal es el caso de la bacteria *Thermotoga maritima* (Schurig et al, 1995).

La segunda mutación que fue seleccionada en ambas mutantes monoméricas fue diferente, de tal forma que al analizar la posición 44 en el alineamiento de las proteínas TIM (diméricas), se pudo apreciar que sólo algunas TIM comparten las mutaciones de Alanina (Ala) y Ser (Ser). Nuevamente tenemos que las mutaciones seleccionadas por evolución dirigida en las variantes de monoTIM ya fueron exploradas por la evolución de manera natural en algunas TIM dimericas, aunque al parecer la posición 44 soporta un alto grado de variación de aminoácidos. Sin embargo, la aparición de las mutaciones en la posición 44 de los monómeros dá una ventaja selectiva sobre la monoTIM que no presenta estos cambios. Al no existir un consenso en la posición 44 esto nos estaría hablando de que muy probablemente existan aminoácidos que en combinación con la prolina

puedan reflejar mejores actividades en monómeros. Tanto la Alanina como la Serina se encuentran en el asa 2 en donde posiblemente ayuden al posicionamiento de la prolina (P43) y como consecuencia al mejoramiento estructural del asa 2 que posicione al asa 1; lo cual nuevamente se verá reflejado en una mayor actividad enzimática de ambos monómeros comparada con la actividad de monoTIM.

Es interesante destacar que la aparición de mutaciones que contribuyen al mejoramiento de la actividad, no ha sido particular de nuestro sistema, ya que Katy Juárez, encontró algo similar para el caso de un activador transcripcional, en donde las mutaciones que fueron seleccionadas ya existían en otros activadores transcripcionales al realizar los alineamientos de las secuencias de aminoácidos (Comunicación personal).

Wierenga et al., (1992), reportaron la formación de una cavidad en las TIM entre las que destacan la de levadura, la de pollo y la de *Trypanosoma brucei* (figura 32). Dicha cavidad es formada cuando la enzima se encuentra en el estado abierto y desaparece cuando pasa al estado cerrado. En particular, la interacción conservada entre los aminoácidos Arg191 y el Asp227 que forman un puente salino, es importante para estabilizar la cavidad formada entre la cercanía del asa 7 (ubicado en la parte de abajo del barril) y el N-terminal de la  $\alpha$  hélice 6. Esta cavidad puede ser de relevancia funcional puesto que existe sólo en el estado abierto dado por el movimiento del carbono beta ( $C\beta$ ) de la Ala 178 (en la enzima dimérica), durante el switch conformacional del estado abierto al cerrado. El hecho de que una de las mutantes monoméricas presente un cambio cerca de esta zona en la monoTIM, sugiere que esta enzima puede ser más activa que la otra mutante seleccionada, quizá por la formación de un nuevo tipo de interacción no covalente (puente de hidrógeno) que esté contribuyendo a la estabilización de la estructura de la monoTIM. Una cavidad conservada también ha sido encontrada en la familia de la mioglobina (Rashin et al, 1986), donde proponen que esta cavidad está asociada con una importante flexibilidad conformacional.

{MONOTIM}	~MSKPOPIAA	ANWKCNGSQ	QSLSEL.IDL	FNSTSI..NH	DVQCVVASTF
{MUTANTEPSS}	~MSKPOPIAA	ANWKCNGSQ	QSLSEL.IDL	FNSTSI..NH	DVQCVVAPSF
{MUTANTEPAT}	~MSKPOPIAA	ANWKCNGSQ	QSLSEL.IDL	FNSTSI..NH	DVQCVVAPAF
{TBRUCEI}	~MSKPOPIAA	ANWKCNGSQ	QSLSEL.IDL	FNSTSI..NH	DVQCVVASTF
{TCRUZI}	MASKPOPIAA	ANWKCNGSE	SLLVPL.IET	LNAATF..DH	DVQCVVAPTF
{LMEXICANA}	MSAKPOPIAA	ANWKCNGTT	ASIEKL.VQV	FNEHTI..SH	DVQCVVAPTF
{HUMAN}	MAPSRKFFVG	GNWKMNGRK	QSLGEL.IGT	LNAAKVPAD.	.TEVVCAAPT
{RHESUS}	MAPSRKFFVG	GNWKMNGRK	QNLGEL.IGT	LNAAKVPAD.	.TEVVCAAPT
{RATON}	MAPTRKFFVG	GNWKMNGRK	KCLGEL.ICT	LNAANVPAG.	.TEVVCAAPT
{GALLUSG}	--APRKFFVG	GNWKMNGDK	KSLGEL.IHT	LNGAKLSAD.	TEVVCGAPS.
{ORYCTOLAGUSC}	--APSRKFFVG	GNWKMNGRK	KNLGEL.ITT	LNAAKVPAD.	.TEVVCAAPT
{LATIMERIAC}	--APRKFFVG	GNWKMNGDK	KSLGEL.IQT	LNAAKVPFT.	.GEIVCAPPE
{CAENORHABDITISE}	--MTRKFFVG	GNWKMNGDY	ASVDGI.VTF	LNASADNSS.	.VDVVVAPPA
{DROSOPHILAM}	--MSRKFCVG	GNWKMNGDQ	KSIAEI.AKT	LSSAALDPN.	TEVVIGCPA.
{DROSOPHILAS}	--MSRKFCVG	GNWKMNGDQ	KSIAEI.AKT	LSSAALDPN.	TEVVIGCPA.
{PLASMODIUMF}	--MTRSFFVG	GNWKLNPST	LSAAKAPVEA	LNKADLDPS.	TEVVVAPPA.
{GIARDIAI}	~MPARRFIG	GNFKCNGSL	DFIKS.HVAA	IAAHKIPDS.	.VDVVIAPSA
{ORYZAS}	--MGRKFFVG	GNWKCNGTT	DQVDKI.VKI	LNEGQIASTD	VVEVVVSPPY
{ZEAM}	--MGRKFFVG	GNWKCNGTT	DQVEKI.VKT	LNEGQVPPSD	VVEVVVSPPY
{ARABIDOPSIS}	--MARKFFVG	GNWKCNGTA	EEVKKI.VNT	LNEAQVPSQD	VVEVVVSPPY
{COPRINUSC}	--MTRSFFVG	GNWKLNPST	LSAAKAPVEA	LNKADLDPS.	.TEVVVAPPA
{ASPERGILLUSN}	--MPRKFFVG	GNFKMNGNA	ESTTTSI.IKN	LNSANLDKS.	.VEVVVSPPA
{SCEREVISIAE}	--MARTFFVG	GNFKLNGSK	QSIKEI.VER	LNTASIPEN.	.VEVVICPPA
{SCHIZOSACCHAOMYCESP}	--MARKFFVG	GNFKMNGSL	ESMKT.IEG	LNTTKLNVGD	.VETVIFPQN
{ECOLI}	---MRHPLVM	GNWKLNGSR	HMVHELVSNL	RKELAGVAGC	..AVAIAPPE
{ENTEROBACTERC}	---MRHPLVM	GNWKLNGSR	HMVNELVANL	RKELAGVTGC	..AVAIAPPD
{HINFLUENZAE}	---MARRPLVM	GNWKLNGSK	AFTKELIEGL	KAELHDVTGC	..DVAIAPPV
{VMARINUS}	---MRHPVVM	GNWKLNGSK	EMVVDLLNGL	NAELEGVTGV	..DVAVAPPA
{PSEUDOMONASS}	---MRRPMVA	GNWLMHGTR	ASVAELIEGL	CKQ.SLPGSV	..DIAVMPAS
{BACILLUSM}	---MRKPIIA	GNWLMNKVL	SEATSFVEEV	KGAVPS.PES	VDSVVCAPA.
{BSUBTILIS}	---MRKPIIA	GNWLMNKTL	GEAVSFVEEV	KSSIPA.ADK	AEAVVCAPA.
{LACTOCOCCUSL}	---MSRKPIIA	GNWLMNKTL	SEAQAFVEAV	KNNLPS.SDN	VESVIGAPA.
{CLOSTRIDIUMA}	---MRTPIIA	GNWLMNNTI	SESLKLIBEL	KPLVKD..A	KAEVVVAPTA
{BORRELIAB}	---MRKTFLA	GNWLMHYTS	AEASIVAKKI	ATEVKT.LKD	DVVIMITPPF
{SYNECHOCYSTISS}	---MRKIIIA	GNWLMHKTQ	AEAQAFVQGF	KPLIEDAAES	REVVLCPVF.
{MYCOBACTERIUML}	--MSRKSLIA	GNWLMNLNH	FEAIALVQKI	AFSLPKYYD	KVDVTVLPPF
{XANTHOBACTERF}	MTAERRPLIA	GNWLMNGLR	AAKSE....L	RTVAAGLAGL	SAETMICPPF
{BRUCELLAA}	---MTKFWIG	TSWLMNKTL	AEA.RLFAEA	LKAADAGRSP	GIQRFVIPPV
{BSTEAROTHERMOPHILUS}	---MRKPIIA	GNWLMHKTL	AEAVQFVEDV	KGHVPP.ADE	VISVVCAPF.
{THERMOTOGAM}	--ITRKLILA	GNWLMHKTI	SEAKKFVSLI	VNELHD..VK	EFEIVVCPFF
CONSENSO	M-MMRKFFVG	GNWLMNTKK	SVKELVIELL	NAA--PASD-	DVEVVVAPPF

Figura 31a. Alineamiento múltiple de proteínas TIM de diferentes organismos. Se resaltan los aminoácidos Lys 13 y la conservación de la prolina en la posición 43 al inicio del asa 2.

{MONOTIM}	VHLAMTKERL	S.....	HPK	FVIAAQNA..	.....	GN	ADALASLKDF	79
{MUTANTEPSS}	VHLAMTKERL	S.....	HPK	FVIAAQNA..	.....	GN	ADALASLKDF	79
{MUTANTEPAT}	VHLAMTKERL	S.....	HPK	FVIAAQNA..	.....	GN	ADALASLKDF	79
{TBRUCEI}	VHLAMTKERL	S.....	HPK	FVIAAQNA..	I.	AKSGAFTG	EVSLPILKDF	86
{TCRUZI}	LHIPMTKARL	T.....	NPK	FQIAAQNA..	I.	TRSGAFTG	EVSLQILKDY	87
{LMEXICANA}	VHIPLVQAKL	R.....	NPK	YVISAENA..	I.	AKSGAFTG	EVSMPIKDI	87
{HUMAN}	AYIDF.ARQK	L.....	DPK	IAVAAQNC..	YKVTNGAFTG	EISPGMIKDC	87	
{RHESUS}	AYIDF.ARQK	L.....	DPK	IAVAAQNC..	YKVTNGAFTG	EISPGMIKDC	87	
{RATON}	AYIDF.ARQK	L.....	DPK	IAVAAQNC..	YKVTNGAFTG	EISPGMIKDL	87	
{GALLUSG}	IYLDL.ARQK	L.....	DAK	IGVAAQNC..	YKVPKGAFTG	EISPAMIKDI	85	
{ORYCTOLAGUSC}	AYIDF.ARQK	L.....	DPK	IAVAAQNC..	YKVTNGAFTG	EISPGMIKDC	86	
{LATIMERIAC}	AYLDL.ARLK	V.....	DPK	FGVAAQNC..	YKVSNGAFTG	EISPAMIKDC	85	
{CAENORHABDITISE}	PYLAY.AKSK	L.....	KAG	VLVAAQNC..	YKVPKGAFTG	EISPAMIKDL	85	
{DROSOPHILAM}	IYLMY.ARNL	L.....	PCE	LGLAQNA..	YKVAKGAFTG	EISPAMIKDI	85	
{DROSOPHILAS}	IYLMY.ARNL	L.....	PCE	LGLAQNA..	YKVAKGAFTG	EISPAMIKDI	85	
{PLASMODIUMF}	LYL.LPIQEI	A.....	GKA	VKVAAQNA..	YFKESGAFTG	EISPKQISDA	86	
{GIARDIAI}	VHLSTAIAAN	T.....	SKQ	LRIAAQNV..	YLEGNGAWTG	ETSVEMLQDM	87	
{ORYZAS}	VFLPV.VKSQ	L.....	RPE	IQVAAQNC..	WVKKGGFTG	EVSAEMLVNL	87	
{ZEAM}	VFLPV.VKSQ	L.....	RQE	FHVAAQNC..	WVKKGGFTG	EVSAEMLVNL	87	
{ARABIDOPSIS}	VFLPL.VKST	L.....	RSD	FFVAAQNC..	WVKKGGFTG	EVSAEMLVNL	87	
{COPRINUSC}	LYL.LPIQEI	A.....	GKA	VKVAAQNA..	YFKESGAFTG	EISPKQISDA	86	
{ASPERGILLUSN}	LYL.LQAREV	A.....	NKE	IGVAAQNV..	FDKPNGAFTG	EISVQQLREA	85	
{SCEREVISIAE}	TYLDYSVSLV	K.....	KPQ	VTVGAQNA..	YLKASGAFTG	ENSVDQIKDV	86	
{SPOMBE}	MYL.ITTRQQ	V.....	KKD	IGVGAQNV..	FDKKNAYTG	ENSAQSLIDA	86	
{ECOLI}	MYIDMAKREA	EG.....	SH	IMLGAQNV..	LNL.SGAFTG	ETSAAMLKDI	87	
{ENTEROBACTERC}	MYLDLAKHAA	DG.....	SH	IILGAQNV..	VNL.SGAFTG	ETSAAMLKDI	87	
{HINFLUENZAE}	MYLGTAEAL	SGCGCSCGK	SVIQLGAQNV	DINVKGAFTG	DISTEMLKDF	95		
{VMARINUS}	LFVDLAERTL	TEAG....	SA	IILGAQNTD.	LNN.SGAFTG	DMSPAMLKEF	89	
{PSEUDOMONASS}	LF.....	TC	QVVDGLKATS	IIVGAQDAA.	IQAEQGALTG	EVASSQLADA	86	
{BACILLUSM}	LFLDRLV...	.EATKGTDLK	I.	GAQNMH.	FE.ENGFTG	EVSPVALADL	86	
{BSUBTILIS}	LFLEKLA...	.SAVKGTDLK	V.	GAQNMH.	FE.ESGFTG	EISPVALKDL	86	
{LACTOCOCCUSL}	LFLAPMA...	.YLRQSELK	L.	AAENSY.	FE.NAGFTG	ENSPAIVDL	87	
{CLOSTRIDIUMA}	VSLETVV...	.NATKGSNIK	V.	AAQNAH.	FE.ESGFTG	EISLKALEEL	85	
{BORRELIAB}	TALSKVS...	.ECIKGSNIL	L.	GAQNMS.	YM.ESGARTS	EISPSMLLEF	87	
{SYNECHOCYSTISS}	TDLGMS...	.QQLHGGRVR	L.	GAQNVH.	WE.ASGAYTG	EISAAMLTEI	87	
{MYCOBACTERIUML}	TDLRSVQ...	.TLVDGDKLR	LTYGAQDLS.	QH.DLGAYTG	DISGAFLAKL	91		
{XANTHOBACTERF}	TLIGAFADV	AG.....	TQ	LMIGGQDCH.	.PAESGAHTG	DISAEMLRDA	87	
{BRUCELLAA}	TAVREVKEIL	SGT.....	S	VKVGAQNMH.	W.ADQGAFTG	EISPLMLKDC	87	
{BACILLUSS}	LFLDRLV...	.QAADGTDLK	I.	GAQTMH.	FA.DQGAFTG	EVSPVMLKDL	87	
{THERMOTOGAM}	TALSEVG...	.EILSGRNIK	L.	GAQNVF.	YE.DQGAFTG	EISPLMLQEI	88	
CONSENSO	VYLA-VARSL	LEA-KGDKP	IGVAAQNA-G	YKVESGAFTG	EISPAMIKD-			

Figura 31b. Alineamiento múltiple de proteínas TIM de diferentes organismos.

{MONOTIM}	GWNWIVLGH	ERRAYYGETN	EIVADKVA	VASGFMV	.IA	CIGETLQERE	128
{MUTANTEPSS}	GWNWIVLGH	ERRAYYGETN	EIVADKVA	VASGFMV	.IA	CIGETLQERE	128
{MUTANTEPAT}	GWNWIVLGH	ERRAYYGETN	EIVADKVA	VASGFMV	.IA	CIGETLQERE	128
{TBRUCEI}	GWNWIVLGH	ERRAYYGETN	EIVADKVA	VASGFMV	.IA	CIGETLQERE	135
{TCRUZI}	GISWVVLGH	ERRLYYGETN	EIVAEKVAQA	CAAGFHV	.IV	CVGETNEERE	136
{LMEXICANA}	GVHWVILGH	ERRTYYGETD	EIVAQKVSEA	CKQGFVM	.IA	CIGETLQORE	136
{HUMAN}	GATWVVLGH	ERRHVFGE	ELIGQKVAHA	LAEGLGV	.IA	CIGEKLDERE	136
{RHESUS}	GATWVVLGH	ERRHVFGE	ELIGQKVAHA	LAEGLGV	.IA	CIGEKLDERE	136
{RATON}	GATWVVLGH	ERRHVFGE	ELIGQKVSHA	LAEGLGV	.IA	CIGEKLDERE	136
{GALLUSG}	GAAWVILGH	ERRHVFGE	ELIGQKVAHA	LAEGLGV	.IA	CIGEKLDERE	134
{ORYCTOLAGUSC}	GATWVVLGH	ERRHVFGE	ELIGQKVAHA	LSEGLGV	.IA	CIGEKLDERE	135
{LATIMERIAC}	GVTWVILGH	ERRHVFGE	ELIGQKVSHA	LSEGLGV	.VA	CIGEKLDERE	134
{CAENORHABDITISE}	GLEWVILGH	ERRHVFGE	ALIAEKTVAHA	LEAGIKV	.VP	CIGEKLEERE	134
{DROSOPHILAM}	GADWVILGH	ERRAIFGE	ALIAEKAHA	LAEGLKV	.IA	CIGETLEERE	134
{DROSOPHILAS}	GADWVILGH	ERRAIFGE	ALIAEKAHA	LAEGLKV	.IA	CIGETLEERE	134
{PLASMODIUMF}	GIPYVILGH	ERRTLFHETS	EVVALKTRAA	LDNGLKV	.IL	CIGETLKERE	135
{GIARDIAI}	GLKHVIVGH	ERRRIMGETD	EQSAKKAKRA	LEKGMTV	.IF	CVGETLDERK	136
{ORYZAS}	SIPWVILGH	ERRSLGSEN	EFVGDKVAYA	LSQGLKV	.IA	CVGETLEQRE	136
{ZEAM}	GVPWVILGH	ERRALLGSEN	EFVGDKVAYA	LSQGLKV	.IA	CVGETLEQRE	136
{ARABIDOPSIS}	DIPWVILGH	ERRAILNESS	EFVGDKVAYA	LAQGLKV	.IA	CVGETLEERE	136
{COPRINUSC}	GIPYVILGH	ERRTLFHETS	EVVALKTRAA	LDNGLKV	.IL	CIGETLKERE	135
{ASPERGILLUSN}	NIDWTILGH	ERRVILKETD	EFIARKTKAA	IEGGLQV	.IF	CIGETLEERE	134
{SCEREVISIAE}	GAKWVILGH	ERRSYFHEDD	KFIADKTKFA	LGQGVGV	.IL	CIGETLEEK	135
{SPOMBEP}	AITYTLTGH	ERRTIFKESD	EFVADKTKFA	LEQGLTV	.VA	CIGETLADRE	135
{ECOLI}	GAQYIIIGH	ERRTYHKESD	ELIAKKFAVL	KEQGLT	.PVL	CIGETEAENE	136
{ENTEROBACTERC}	GAKYIIIGH	ERRTYHKESD	EFIAKKFAVL	KEQGLI	.PVL	CIGETEAENE	136
{HINFLUENZAE}	GAKYIIIGH	ERRTYHKESD	EFVAKKFGAL	KEAGLV	.PVL	CIGESEAEENE	144
{VMARINUS}	GATHIIIGH	ERREYHAESD	EFVAKKFAFL	KENGLT	.PVL	CIGESDAQNE	138
{PSEUDOMONASS}	GCKLVLVGH	ERRQLIGE	DVLNKKFAAI	QAKGLT	.PVL	CVGETLEERK	135
{BACILLUSM}	GVNVVILGH	ERREMPAETD	ETVNQKTIAA	FKHGLT	.PIV	CCGETNEEYE	135
{BSUBTILIS}	GVDYCVIGH	ERREMPAETD	ETVNKKAHAA	FKHGIV	.PII	CVGETLEERE	135
{LACTOCOCCUSL}	GIEYIIIGH	ERREYFHETD	EDINKKAKAI	FAAGAT	.PIL	CCGETLETFE	136
{CLOSTRIDIUMA}	GVSIVILGH	ERRQYFNEDT	CALNKKVAAA	FAHNIT	.PIL	CCGETLEERE	134
{BORRELIAB}	GVEYVILGH	ECLYLAETD	EIINKKILAG	LKHFPKYLIL		CVGETLDERD	137
{SYNECHOCYSTISS}	GIHYVVIGH	ERRQYFGETD	ETANLRVLA	QKAGLI	.PIL	CVGESKAQRD	136
{MYCOBACTERIUML}	GCSFVLVGH	ERRTYHDEGD	ALVAAKTAAA	LKNSLT	.PIV	CIGEYLEIRE	140
{XANTHOBACTERF}	GAVAVILGH	ERRIDHQEGD	AIVKAKVAAA	WRAGL	.LPVV	CVGETLVERD	136
{BRUCELLAA}	NLDIVELGH	ERREHFGETN	ETVGLKVEAA	VRHGL	.IPLI	CIGETLEDRE	136
{BACILLUSS}	GVTYVILGH	ERRQMPAETD	ETVNKKVLA	FTRGLI	.PII	CCGESLEERE	136
{THERMOTOGAM}	GVEYVIVGH	ERRRIFKEDD	EFINRKKVAV	LEKGMT	.PIL	CVGETLEERE	137
CONSENSO	GATWVILGH	ERR-YFGE	ELVAKKVA	LAQGL	-VPIA	CIGETLEERE	

Figura 31c. Alineamiento múltiple de proteínas TIM de diferentes organismos. Se resalta la His 95 uno de los aminoácidos involucrados en el sitio activo.

{MONOTIM}	SGRTAVVVL	QIAAIAKCLK	KAD..W	AKVVIAY	EPV	WAIGTGKVAT	172
{MUTANTEPSS}	SGRTAVVVL	QIAAIAKCLK	KAD..W	AKVVIAY	EPV	WAIGTGKVAT	172
{MUTANTEPAT}	SGRTAVVVL	QIAAIAKCLK	KAD..W	AKVVIAY	EPV	WAIGTGKVT	172
{TBRUCEI}	SGRTAVVVL	QIAAIAKCLK	KAD..W	AKVVIAY	EPV	WAIGTGKVAT	179
{TCRUZI}	AGRTAAVLT	QLAAVAQKLS	KEA..W	SRVVIAY	EPV	WAIGTGKVAT	180
{LMEXICANA}	ANQTAKVLS	QTSIAAKLT	KDA..W	NQVVLAY	EPV	WAIGTGKVAT	180
{HUMAN}	AGITEKVVFE	QTKVIADNV	K.D..W	SKVVLAY	EPV	WAIGTGKTAT	178
{RHESUS}	AGITEKVVFE	QTKVIADNV	K.D..W	SKVVLAY	EPV	WAIGTGKTAT	178
{RATON}	AGITEKVVFE	QTKVIADNV	K.D..W	SKVVLAY	EPV	WAIGTGKTAT	178
{GALLUSG}	AGITEKVVFE	QTKAIADNV	K.D..W	SKVVLAY	EPV	WAIGTGKTAT	176
{ORYCTOLAGUSC}	AGITEKVVFE	QTKVIADNV	K.D..W	SKVVLAY	EPV	WAIGTGKTAT	177
{LATIMERIAC}	AGITEGVVFE	VTEVIADDV	K.D..W	SKVVLAY	EPV	WAIGTGKTAS	176
{CAENORHABDITISE}	AGHTKDVNFR	QLQAIQDK	.G V.S..W	ENIVIAY	EPV	WAIGTGKTAS	176
{DROSOPHILAM}	AGKTNEVVAR	QMCAYAQKI	K.D..W	KNVVVAY	EPV	WAIGTGKTAT	176
{DROSOPHILAS}	AGKTNEVVAR	QMCAYAQKI	K.D..W	KNVVVAY	EPV	WAIGTGKTAT	176
{PLASMODIUMF}	EGRTAAVCEE	QLSAVVKQLK	EED..W	SNIVIAY	EPV	WAIGTGKVAT	179
{GIARDIAI}	ANRTMEVNIA	QLEALGKELG	ESKMLW	KEVVIAY	EPV	WSIGTGVVAT	182
{ORYZAS}	SGSTMDVVAA	QTKAISERI	K.D..W	TNVVVAY	EPV	WAIGTGKVAT	178
{ZEAM}	AGSTMDVVAA	QTKAIAEKI	K.D..W	SNVVVAY	EPV	WAIGTGKVAT	178
{ARABIDOPSIS}	AGSTMDVVAA	QTKAIADRV	T.N..W	SNVVIAY	EPV	WAIGTGKVAS	178
{COPRINUSC}	EGRTAAVCEE	QLSAVVKQLK	EED..W	SNIVIAY	EPV	WAIGTGKVAT	179
{ASPERGILLUSN}	ANKTIDVVTR	QLNAAAKELS	KEQ..W	AKVVIAY	EPV	WAIGTGKVAT	178
{SCEREVISIAE}	AGKTLDVVER	QLNAVLEEVK	.D..W	TNVVVAY	EPV	WAIGTGLAAT	177
{SPOMBE}	ANETITVVVR	QLNAIADKV	.QN..W	SKIVIAY	EPV	WAIGTGKTGT	177
{ECOLI}	AGKTEEVVAR	QIDAVLKTQG	AAAF..	EGAVIAY	EPV	WAIGTGKSAT	180
{ENTEROBACTERC}	AGKTEEVVAR	QIDAVLKTQG	AAAF..	EGAVIAY	EPV	WAIGTGKSAT	180
{HINFLUENZAE}	AGKTEEVVAR	QIDAVINALG	VEAF..	NGAVIAY	EPI	WAIGTGKSAT	188
{VMARINUS}	AGETMAVVAR	QLDAVINTQG	VEAL..	EGAVIAY	EPI	WAIGTGKAAT	182
{PSEUDOMONASS}	AGQTLVVGR	QLDSVIAEFG	VNAL..	VNAVVIAY	EPV	WAIGTGLTAS	179
{BACILLUSM}	QDQTKTVAN	QVQKALAGLT	DEQV..	KQTVIAY	EPI	WAIGTGKSST	179
{BSUBTILIS}	AGKTNDLVAD	QVKKGLAGLS	EEQV..	AASVIAY	EPI	WAIGTGKSST	179
{LACTOCOCCUSL}	AGKTAEVVSG	QIEAGLAGLT	AEQV..	SNLVIAY	EPI	WAIGTGKTAT	180
{CLOSTRIDIUMA}	ANVTNEVTGK	QIKLDLAGLS	AEQA..	AKVVIAY	EPI	WAIGTGKTAT	178
{BORRELIAB}	SGKTLEVVLN	QVKKGLNCVS	ESDI..	QRIILAY	EPV	WAIGTGKTAT	181
{SYNECHOCYSTISS}	AGETEQVIVD	QVKKGLVNV	Q....	SNLVIAY	EPI	WAIGTGDTC	177
{MYCOBACTERIUM}	VGEHVSHCQN	QLRGLAGLS	PEQI..	GNVVIVY	EPV	WAIGTGRVAS	184
{XANTHOBACTERF}	AGEAAVVTR	QVRQSV..E	GATA..	VSLVIAY	EPI	WAIGTRTPT	178
{BRUCELLAA}	SGRAAAVLEE	EVRGALSKLS	EAQKQ.	AEILFAY	EPV	WAIGENGIPA	181
{BACILLUSS}	AGQTNVAVAS	QVEKALAGLT	PEQV..	KQAVIAY	EPI	WAIGTGKSST	180
{THERMOTOGAM}	KGLTFCVVEK	QVREGFYGLD	KEEA..	KRVVIAY	EPV	WAIGTGRVAT	181
CONSENSO	AGKTEEVVAR	QLKAIKCLK	KEP-LW	S-VVIAY	EPV	WAIGTGKTAT	

Figura 31d. Alineamiento múltiple de proteínas TIM de diferentes organismos. Se resalta el Glu 167 uno de los aminoácidos involucrados en el sitio activo.

{MONOTIM}	PQQAQEAHAL	IRSWSSKIG	ADVRGELRIL	YGGSVNGKNA	RTLYQQRDVN	222
{MUTANTEPSS}	PQQAQEAHAL	IRSWSSKIG	ADVRGELRIL	YGGSVSGKNA	RTLYQQRDVN	222
{MUTANTEPAT}	PQQAQETHAL	IRSWSSKIG	ADVRGELRIL	YGGSVNGKNA	RTLYQQRDVN	222
{TBRUCEI}	PQQAQEAHAL	IRSWSSKIG	ADVAGELRIL	YGGSVNGKNA	RTLYQQRDVN	229
{TCRUZI}	PQQAQEVHEL	LRRWVRSKLG	TDIAAQLRIL	YGGSVTAKNA	RTLYQMRDIN	230
{LMEXICANA}	PEQAQEVHLL	LRKWVSENIG	TDVAAKLRLIL	YGGSVNAANA	ATLYAKPDIN	230
{HUMAN}	PQQAQEVHEK	LRGWLKSNSV	DAVAQSTRII	YGGSVTGATC	KELASQPDVD	228
{RHESUS}	PQQAQEVHEK	LRGWLKSNSV	EAVAQSTRII	YGGSVTGATC	KELASQPDVD	228
{RATON}	PQQAQEVHEK	LRGWLKSNSV	DGVAQSTRII	YGGSVTGATC	KELASQPDVD	228
{GALLUSG}	PQQAQEVHEK	LRGWLKTHSV	DAVAQSTRII	YGGSVTGGNC	KELASQHDVD	226
{ORYCTOLAGUSC}	PQQAQEVHEK	LRGWLKSNSV	DAVAQSTRII	YGGSVTGATC	KELASQPDVD	227
{LATIMERIAC}	PQQSQELHGK	LRKWLKENVS	ETVADSVRII	YGGSVTGATC	KELASEPDVD	226
{CAENORHABDITISE}	GEQAQEVHEW	IRAFLKEKVS	PAVADATRII	YGGSVTADNA	AELGKKPDID	226
{DROSOPHILAM}	PDQAQEVHAF	LRQWLSDNIS	KEVSASLRIQ	YGGSVTAANA	KELAKKPDID	226
{DROSOPHILAS}	PDQAQEVHAF	LRQWLSDNIS	KEVSASLRIQ	YGGSVTAANA	KELAKKPDID	226
{PLASMODIUMF}	TSQAQETHVD	VRKYLATAVS	PKVASETRVI	YGGSVNAANS	KDLASQQDID	229
{GIARDIAI}	PEQAEEVHVG	LRKWFAEKVC	AEGAQHIRII	YGGSANGSNC	EKLGQCPNID	232
{ORYZAS}	PDQAQEVHDG	LRKWLAANVS	AEVAESTRII	YGGSVTGANC	KELAAKPDVD	228
{ZEAM}	PAQAQEVHAS	LRDWLKTNAS	PEVAESTRII	YGGSVTAANC	KELAAQPDVD	228
{ARABIDOPSIS}	PAQAQEVHDE	LRKWLAKNSV	ADVAATRII	YGGSVNGGNC	KELGGQADVD	228
{COPRINUSC}	TSQAQETHVD	VRKYLATAVS	PKVASETRVI	YGGSVNAANS	KDLASQQDID	229
{ASPERGILLUSN}	TEQAQEVHSA	IRKWLKDAIS	AEEAENTRII	YGGSVSEKNC	KDLAKEADID	228
{SCEREVISIAE}	PEDAQDIHAS	IRKFLASKLG	DKAASELRIL	YGGSANGSNA	VTFKDKADVD	227
{SPOMBE}	PEEAQEVHAE	IRKWATNKLK	ASVAEGLRVI	YGGSVTGGNC	KEFLKFHDID	227
{ECOLI}	PAQAQAVHKF	IRDHIAK.V	ANIAEQVIIQ	YGGSVNASNA	AELFAQPDID	229
{ENTEROBACTERC}	PAQAQAVHKF	IRDHIAKA.D	AKVAEQVIIQ	YGGSVNASNA	AELFTQPDID	229
{HINFLUENZAE}	PAQAQAVHAF	IRGHIAAK.S	QAVAEQVIIQ	YGGSVNDANA	AELFTQPDID	237
{VMARINUS}	AEDAQRHAHQ	IRAHIAEK.S	EAVAKNVVIQ	YGGSVKPENA	AAYFAQPDID	231
{PSEUDOMONASS}	PQEAQEVHAA	IRAQLAKE.N	AEVAQGVRLI	YGGSVKAANA	VELFSMPDID	228
{BACILLUSM}	AEGANEVCAY	IRSVVAEQFS	QDVADAVRIQ	YGGSVKPANI	KEYMSQSDID	229
{BSUBTILIS}	AKDANDVCAH	IRKTVAESFS	QEAADKLRIQ	YGGSVKPANI	KEYMAESDID	229
{LACTOCOCCUSL}	NEIADETCGV	VRSTVEKLYG	KEVSEAVRIQ	YGGSVKPETI	EGLMAKENID	230
{CLOSTRIDIUMA}	DEQANETIGA	IRKTVEVMFG	KEVAEKVRIQ	YGGSVKPNTI	KAQMAKPEID	228
{BORRELIAB}	KEEAEEVHKA	IRLEITKLYS	KSASDNIIQ	YGGSVNSNNV	KELMNEPNID	231
{SYNECHOCYSTISS}	ATEANRVIGL	IREQLTN...	...SQVTIQ	YGGSVNANNV	DEIMAQPEID	220
{MYCOBACTERIUML}	AADAQEVCEA	IRKELGALAS	PQVAETVRVL	YGGSLNAKNI	GDIVAQQDVD	234
{XANTHOBACTERF}	TDDVAEVHGA	IRHILAERFG	AE.ANGIRIL	YGGSVKPDNA	AALLATANVD	227
{BRUCELLAA}	SADYADAR..	.QAEIIAVAQ	SVLARRVPCL	YGGSVNPGNC	EELIACPHID	228
{BACILLUSS}	PEDANSVCGH	IRSVVSRFLG	PEAAEAIRIQ	YGGSVKPDNI	RDFLAQQQID	230
{THERMOTOGAM}	PQQAQEVHAF	IRKLLSEMYD	EETAGSIRIL	YGGSIKPDNF	LGLIVQKDID	231
CONSENSO	PQQAQEVHAL	IRKWLASNSV	AEVAES-RII	YGGSVNAANA	KELAAQPDID	

Figura 31e. Alineamiento múltiple de proteínas TIM de diferentes organismos.

{MONOTIM}	GFLVGGASLK	PEF.VDIIKA	TQ-----	243
{MUTANTEPSS}	GFLVGGASLK	PEF.VDIIKA	TQ-----	243
{MUTANTEPAT}	GFLVGGASLK	PEF.VDIIKA	TQ-----	243
{TBRUCEI}	GFLVGGASLK	PEF.VDIIKA	TQ-----	250
{TCRUZI}	GFLVGGASLK	PEF.VEIIEA	TK-----	251
{LMEXICANA}	GFLVGGASLK	PEF.RDIIDA	TR-----	251
{HUMAN}	GFLVGGASLK	PEF.VDIINA	KQ-----	249
{RHESUS}	GFLVGGASLK	PEF.VDIINA	KQ-----	249
{RATON}	GFLVGGASLK	PEF.VDIINA	KQ-----	249
{GALLUSG}	GFLVGGASLK	PEF.VDIINA	KH-----	247
{ORYCTOLAGUSC}	GFLVGGASLK	PEF.VDIINA	KQ-----	248
{LATIMERIAC}	GFLVGGASLK	PEF.VEYKDV	RQ-----	247
{CAENORHABDITISE}	GFLVGGASLK	PDF.VKIINA	RS-----	247
{DROSOPHILAM}	GFLVGGASLK	PEF.VDIINA	RQ-----	247
{DROSOPHILAS}	GFLVGGASLK	PEF.VDIINA	RQ-----	247
{PLASMIDIUMF}	GFLVGGASLK	PEF.VDIINA	RKA-----	250
{GIARDIAI}	GFLVGGASLK	PEFMTMIDIL	AKTRT----	245
{ORYZAS}	GFLVGGASLK	PEF.HRHHQL	RHREVRL---	254
{ZEAM}	GFLVGGASLK	PEF.IDIINA	ATVKSA----	253
{ARABIDOPSISIST}	GFLVGGASLK	PEF.IDIIKA	AEVNKSA---	254
{COPRINUSC}	GFLVGGASLK	PEF.VDIINA	RKA-----	251
{ASPERGILLUSN}	GFLVGGASLK	PAF.VDIVNA	RL-----	249
{SCEREVISIAE}	GFLVGGASLK	PEF.VDIINS	RN-----	248
{SPOMBE}	GFLVGGASLK	PEFPTNIVNV	HSL-----	250
{ECOLI}	GALVGGASLK	ADAFIVVKA	AEAQA----	256
{ENTEROBACTERC}	GALVGGASLK	ADAFIVVKA	AEAQA----	256
{HINFLUENZAE}	GALVGGASLK	APAFIVVKA	AAAAN----	263
{VMARINUS}	GALVGGALD	AKSFAATAKA	AEAQA----	257
{PSEUDOMONASS}	GGLIGGASLN	ADEFGAICRA	AGN-----	251
{BACILLUSM}	GALVGGASLE	ADSFLQLLEA	GK-----	251
{BSUBTILIS}	GALVGGASLE	PQSFLQLLEE	GQYE-----	253
{LACTOCOCCUSL}	GALVGGASLE	ADSFLALLEM	YK-----	252
{CLOSTRIDIUMA}	GALVGGASLK	AADFAAIVNF	-----	248
{BORRELIAB}	GALIGGASLK	AESFLSIINN	VL-----	253
{SYNECHOCYSTISS}	GALVGGASLE	PQSFAIVNF	QP-----	242
{MYCOBACTERIUML}	GGLVGGASLD	GAQFATLAVI	AAGGPLP---	261
{XANTHOBACTERF}	GALVGGASLK	AADFLAIARA	VG-----	249
{BRUCELLAA}	GLFIGRSAWN	VEGYLDILAR	CATKVQAN--	256
{BACILLUSS}	GPLVGGASLE	PASFLQLVEA	GRHE-----	254
{THERMOTOGAM}	GGLVGGASLK	.ESFIELARI	MRGVIS----	256
CONSENSO	GFLVGGASLK	PEFFVDIINA	RQAQA-A---	

Figura 31f. Alineamiento múltiple de proteínas TIM de diferentes organismos.

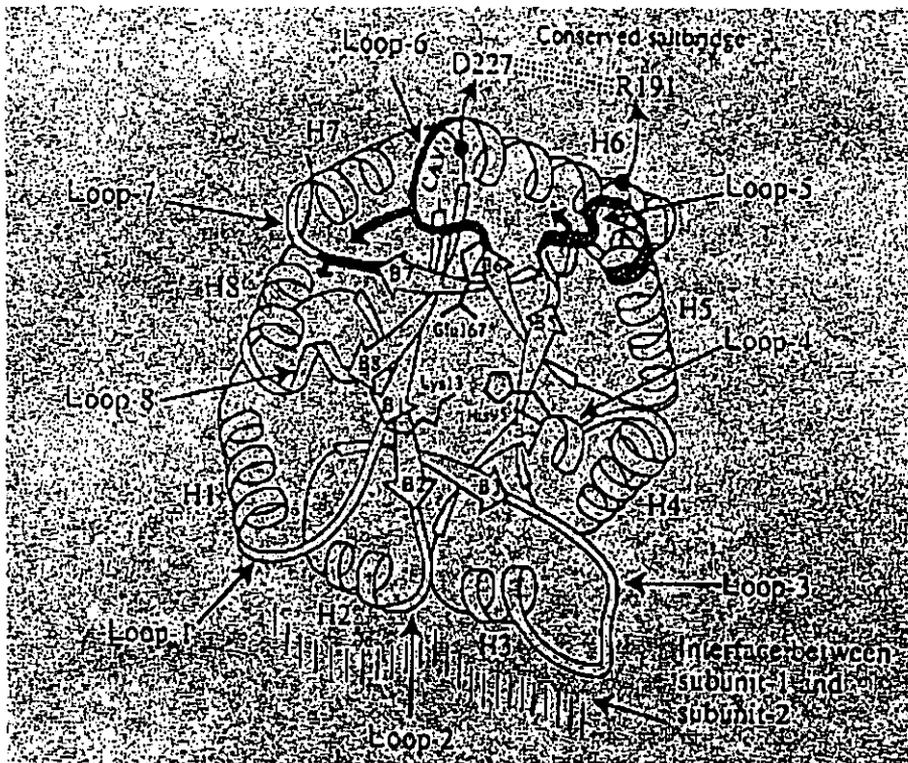


Figura 32. Una subunidad del dímero de la Triosafosfato isomerasa en donde se representa la interacción de tipo no covalente conservada entre los residuos D227 y R191. Los segmentos polipeptídicos que sufren rearrreglos conformacionales están sombreados. Las flechas indican el movimiento de apertura y cierre.

## VII. CONCLUSIONES.

1.- Se cuenta con una cepa de *Escherichia coli tpi* - (VEJM101) capaz de recuperar su viabilidad en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono cuando es complementada con un gene activo de triosafosfato isomerasa. Experimentos de complementación con diferentes variantes de *tpi* de *Trypanosoma brucei* nos permitieron discriminar bajo diferentes condiciones de crecimiento mutantes que van del rango de: 100 hasta 1000 veces menos activas que el dímero de *Trypanosoma brucei*.

2.- Se establecieron las condiciones para la PCR mutagénica a baja frecuencia (0.6%), donde al analizar 5 clonas al azar que no fueron sometidas a selección se pudo observar la presencia de cambios: dobles (un caso), triples (tres casos) y cuádruples (un caso) a nivel de nucleótido. Es importante tomar en cuenta la tasa de mutagenicidad cuando se piense realizar pocos cambios en las proteínas que uno desee estudiar, ya que una alta tasa de mutación, muy probablemente incorpora o aumenta la probabilidad de introducir mutaciones deletéreas para la actividad y/o la estabilidad estructural de la enzima.

3.- Se cuentan con dos mutantes más activas que monoTIM. Ambas mutantes son capaces de complementar la cepa VEJM101 mostrando crecimiento en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono+IPTG, tanto en medio líquido como en medio sólido. Estas mutantes son considerablemente más activas que la enzima que les dió origen (monoTIM).

4.- Ambas mutantes comparten mutaciones en las posiciones 43 y 44, mientras que las otras mutaciones caen en regiones diferentes. La presencia de prolina en la posición 43 es uno de los hallazgos más importantes de este trabajo debido a que estas mutaciones se encuentran representadas en las TIM diméricas alineadas de otros organismos, de tal forma que para obtener enzimas monoméricas más activas que monoTIM fué necesario la introducción de mutaciones presentes en las TIM diméricas de otros organismos. Incluso los cambios que aparecen en la posición 44 de estas mutantes ya están representados en enzimas diméricas, lo cual nuevamente apoya, la idea de que para que se incorporen mutaciones en monómeros activos de *T. brucei* es necesario la introducción de cambios que la evolución ya probó en otros dímeros.

5.- La mutante más activa, contiene además de los cambios en los residuos 43 y 44, una mutación en el residuo 179 de Ala a Thr. Esta posición se encuentra en la mitad de la hélice 6, lejana al sitio activo. Para saber si esta mutación tiene alguna repercusión en la actividad, tendría que ser segregada de las otras dos mutaciones y de ser así, su contribución podría estar asociada a una mayor estabilidad de la proteína dada por la capacidad de formar puentes de hidrogeno de la treonina.

## **VIII. PERSPECTIVAS**

1.- Es necesario ver la expresión de estas proteínas monoméricas y purificarlas para medir sus parámetros catalíticos y poder compararlos con los reportados para la monoTIM, para lo cual es necesario reclonar los genes en un plásmido del tipo pET3a, de tal forma que la expresión del gene estaría regulada por un promotor fuerte. La cepa en la que posteriormente hay que realizar la transformación es la BL21. Esta cepa tiene el gene que codifica para la RNAPolimerasa del fago T7 (esta polimerasa es la responsable de dirigir la expresión del promotor del plásmido pET3a).

2.- Es importante segregar las mutaciones para poder entender la relevancia de las mismas. La segregación de las mutaciones se puede realizar por PCR sitio dirigida y el empleo de megaprimers. Es importante secuenciar totalmente las nuevas mutantes para observar la presencia de las mutaciones en los sitios blanco y ausencia de mutaciones extras introducidas por la Taq polimerasa. Finalmente, hay que transformarlas en la cepa VEJM101 en medio selectivo y analizar los fenotipos, también hay que realizar las cinéticas de crecimiento incorporando los controles positivos y negativos del sistema.

3.- Finalmente sería deseable cristalizar las variantes obtenidas para analizar el efecto estructural que tuvieron las mutaciones ocurridas y comprobar nuestra hipótesis sobre la rigidización del asa 1 como consecuencia de la rigidización del asa 2. El asa 1 hasta ahora no se encuentra definido en la estructura cristalina de monoTIM.

## X.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Akanuma.S., Yamagishi, A., Tanaka. N and Oshida, T. (1998). Serial increase in the thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* by experimental evolution. *Protein Science*. 7:698-705.
- 2.- Alber, T. and Kawasaki, G. (1982). Nucleotide sequence of the triosephosphate isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae* *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (5), 419-434.
- 3.- Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K. and Maes, D. (1998). Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* 273 (4), 2199-2206.
- 4.- Anderson, A and Cooper, R. A. (1970). Genetic Mapping of a Locus for Triosephosphate Isomerase on the Genome of *Escherichia coli* K12. *Journal of General Microbiology.* 62:329-334.
- 5.- Artavanis-Tsakonas, S and Harris, J. I. (1980). Primary structure of triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur.J.Biochem.*108:599-611.
- 6.- Balbul, J. (1978). *J. Biol.Chem.* 253:4350-4355.
- 7.- Bertolaet, L. B and Knowles, J. R. (1995). Complementation of fragments of triosephosphate isomerase defined by exon boundaries. *Biochemistry.* 34: 5736-5743.
- 8.- Blattner, F. R., Plunkett III, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, H. A., Rose, D. J., Mau. B and Shao Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 277:1453-1462.
- 9.- Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R and Wierenga, R. K. (1994). Design, creation and characterisation of a stable monomeric triosephosphate isomerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 91:1515-1518.
- 10.- Borchert, T. V., Abagyan, R., Kishan, K. V., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K. (1993). The crystal structure of an engineered monomeric triosephosphate isomerase, monoTIM: the correct modelling of an eight-residue loop. *Structure.*1:205-213.
- 11.- Bork. P., Gellerich. J., Groth. H., Hooft. R and Martin. F. (1995). Divergent evolution of a  $\alpha/\beta$ -barrel subclass: detection of numerous phosphate-binding sites by motif search. *Protein Science.* 4:268-274.
- 12.- Brange, J., Ribel, U., Hansen, J. F., M. T., Havelund, S., Melberg,S. G., Norris, F., Snel,L., Sorencen , A. R and Vogt, H. O. (1998). *Nature.* 33:679-682.
- 13.- Buchholz, F., Angrand, P. O and Stewart, A. F. (1998). Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nature Biotechnology.* 16:657-662.
- 14.- Cadwell, R. C and Joyce, G. F. (1992). Randomization of genes by PCR Mutagenesis. *Research.* 2:28-33.

- 15.- Cancilla, M. R., Davidson, B. E., Hillier, A. J., Nguyen, N. Y. and Thompson, J. (1995). The *Lactococcus lactis* triosephosphate isomerase gene *tpi* is monocistronic. *Microbiology*. 141:229-238.
- 16.- Cheng, J., Mielnicki, L. M., Pruitt, S. C. and Maquat, L. E. (1990). Nucleotide sequence of murine triosephosphate isomerase cDNA. *Nucleic Acids Res.* 18 (14), 4261.
- 17.- Corran, P. H and Waley, S. G. (1975). The amino acid sequence of rabbit muscle triose phosphate isomerase. *Biochem. J.* 145 (2), 335-344.
- 18.- Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E and Stemmer, W. P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA Shuffling. *Nature Biotechnology*. 14:315-319.
- 19.- Davenport, R. C., Bash, P. A., Seaton, B. A., Karplus, M., Petsko, G. A and Ringe, D. (1991). Structure of the triosephosphate isomerase phosphoglycolate hydroxamate complex: An analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry*. 30:5821-5826.
- 20.- Deirdre, R and Farber, K. G. (1995). The structure and evolution of  $\alpha/\beta$  barrel proteins. *Proteins Motifs*. 14:315-319.
- 21.- Doolittle, R. F. (1994). Convergent evolution: The need to be explicit. *Trends. Biochem. Sci.* 19:15-18
- 22.- Farber, G. K. (1993). An  $\alpha/\beta$  -barrel full of evolutionary trouble. *Current biology*. 3:409-412.
- 23.- Farber, G. K and Petsko, G. A. (1990). The evolution  $\alpha/\beta$  barrels enzymes. *TIBS*. 15:228-234.
- 24.- Hamilton, M. C., Aldea, M., Washburn, B. K., Babitzke, P and Kushner, S. R. (1989). New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 171:4617-4622.
- 25.- Hasson, E., Wang, I. N., Zeng, L. W., Kreitman, M. and Eanes, W. F. (1998). Nucleotide variation in the triosephosphate isomerase (*Tpi*) locus of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Mol. Biol. Evol.* 15 (6), 756-769.
- 26.- Josep, D., Petsko, G. A and Karplus, M. (1990). Anatomy of a conformational change: hinged "lid" motion of the triosephosphate isomerase loop. *Science*. 249:1425-1428.
- 27.- Kaneko, T., Tanaka, A., Sato, S., Kotani, H., Sazuka, T., Miyajima, N., Sugiura, M. and Tabata, S. (1995). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain. *DNA Res.* 2 (4), 153-166.
- 28.- Keeling, P. J and Doolittle, W. F. (1997). Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha-proteobacterial origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:1270-1275.
- 29.- Kirschner, K and Eder, J. (1992). Stable substructures of eightfold  $\alpha / \beta$  -barrels proteins: Fragment complementation of phosphoribosylanthranilate isomerase. *Biochemistry*. 31:3617-3625.

- 30.- Kishan, R., Zeelen, J., Noble, M., Borchert, T. V., Mainfroid, V., Gora, K., Martial, J. A and Wierenga, R. K. (1994). Modular mutagenesis of a TIM-barrel enzyme: the crystal structure of a chimeric *E. coli* TIM having the eighth  $\alpha / \beta$ -unit replaced by the equivalent unit of chicken TIM. *Protein Engineering*. 7:945-951.
- 31.- Knowles, J. (1991). Enzyme catalysis: not different just better. *Nature*.350:121-124.
- 32.- Knowles, J and Albery, W. J. (1977). Perfection in enzyme catalysis: The energetics of triosephosphate isomerase. *Acc.Chem.Res.*10:105-111.
- 33.- Kohl, L., Callens, M., Wierenga, R. K., Opperdoes, F. R and Michels, P. A. (1994) Triose-phosphate isomerase of *Leishmania mexicana*. Cloning and characterization of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and analysis of the protein. *Eur. J. Biochem.* 220 (2), 331-338.
- 34.- Kolb, E., Harris, J. I and Bridgen, J. (1974). Triose phosphate isomerase from the coelacanth. An approach to the rapid determination of an amino acid sequence with small amounts of material. *Biochem. J.* 137 (2), 185-197.
- 35.- Kosa, L. J and Sweasy, B. J. (1999). 3'-Azido-3'-deoxythymidine-resisten mutant of DNA polymerase  $\beta$  Identified by in vivo selection. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:3851-3858.
- 36.- Krymkiewicz, N., Diéguez, E., Rekart, U. D and Zwaig, N. (1971). Properties and mode of action of a bactericidal compound (= methylglyoxal) produced by a mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriology*.108:1338-1347.
- 37.- Kumamaru, T., Suenaga, H., Mitsuoka, M., Watanabe, T and Furukawa, K. (1998). Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. *Nature Biotechnology*. 16:663-666.
- 38.- Leyva-Vazquez, M. A. and Setlow, P. (1994) Cloning and nucleotide sequences of the genes encoding triosephosphate isomerase, phosphoglycerate mutase and enolase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176 (13), 3903-3910.
- 39.- Lodi, P. J., Chang, L. C., Knowles, J. R and Komives, E. A. (1994). Triosephosphate Isomerase requires a positively charged active site: The role of lysine-12. *Biochemistry*. 33:2809-2814.
- 40.- Logsdon, J. M., Tyshenko, M. G., Dixon, C., D-Jafari, J., Walker, V. K and Palmer, J. D. (1995). Seven newly discovered intron positions in the triose-phosphate isomerase gene: evidence for the introns-late theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (18), 8507-8511.
- 41.- Lolis, E and Petsko, G. A. (1990). Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5 Å resolution: Implications for catalysis. *Biochemistry*. 29:6619-6622.
- 42.- Luger, K., Hommel, U., Herold, M., Hofsteenge, J and Kirschner, K. (1989). Correct folding of circularly permuted variants of a  $\alpha/\beta$  barrel enzyme in vivo. *Science*. 243:206-210.
- 43.- Luger, K., Szadkowski, H and Kirschner, K. (1990). An 8-fold  $\alpha/\beta$  barrel protein with

ESTA TESIS FO SERE  
 DEBE DE REGI  
 STRAR EN LA  
 BIBLIOTECA  
 DE LA UNAM

redundant folding possibilities. *Protein engineering*. 3:249-258.

44.- McKnight, G. L., O'Hara, P. J and Parker, M. L. (1986). Nucleotide sequence of the triosephosphate isomerase gene from *Aspergillus nidulans*: Implications for a differential loss of introns. *Cell*. 46 (1), 143-147.

45.- Mainfroid, V., Goraj, K., Delrue, F., Houbrechts, A., Loiseau, A., Gohimont, A., Noble, M. E., Borchert, T. V., Wierenga, R. K and Martial, J. A. (1993). Replacing the ( $\alpha/\beta$ )-unit 8 of *E. coli* TIM with its chicken homologue leads to a stable and active hybrid enzyme. *Protein Engineering*. 6:893-900.

46.- Marchionni, M and Gilbert, W. (1986). The triosephosphate isomerase gene from maize: introns antedate the plant-animal divergence. *Cell*. 46 (1), 133-141.

47.- Matsumura, I and Ellington, A. D. (1996). DNA Shuffling brightens prospects for GFP. *Nature Biotechnology*. 14: 366.

48.- Matsuura, T., Miyai, K., Trakulnaleamsa, S., Yomo, T., Shima, Y., Miki, S., Yamamoto, K and Urabe, I. (1999). Evolutionary molecular engineering by random elongation mutagenesis. *Nature Biotechnology*. 17:58-61.

49.- Maquat, L. E., Chilcote, R. and Ryan, P. M. (1985). Human triosephosphate isomerase cDNA and protein structure. Studies of triosephosphate isomerase deficiency in man. *J. Biol. Chem.* 260 (6), 3748-3753.

50.- Meijer, Per-Johan., Holmberg, N., Grundstrom, G and Bulow, L. (1996). Directed evolution of a type I antifreeze protein expressed in *Escherichia coli* with chloride as selective pressure and its effect on antifreeze tolerance. *Protein Engineering*. 9:1051-1054.

51.- Mowatt, M. R., Weinbach, E. C., Howard, T. C and Nash, T. E. (1994). Complementation of an *Escherichia coli* glycolysis mutant by *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase. *Exp. Parasitol.* 78:85-92.

52.- Noble, M. E., Zeelen, J. P and Wierenga, R. K. (1993). Structures of the open and closed state of trypanosomal triosephosphate isomerase, as observed in a new crystal form: Implications for the reaction mechanism. *Proteins Struct Funct Genetic*. 16:311-326.

53.- Old, S. E and Mohrenweiser, H. W. (1988). Nucleotide sequence of the triosephosphate isomerase gene from *Macaca mulatta*. *Nucleic Acids Res* 26;16(18):9055.

54.- Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramirez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gomez-Puyou, A., Tuena de Gomez-Puyou, M and Perez-Montfort, R. (1997). Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 244 (3), 700-705.

55.- Pichersky, E., Gottlieb, L. D and Hess, J. F. (1984). Nucleotide sequence of the triosephosphate isomerase gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 195 (1-2), 314-320.

56.- Rashin, A. A., Iofin, M and Honing, B. (1986). Internal Cavities and Buried Waters in

Globular Proteins. *Biochemistry*. 25:3619-3625.

57.- Reardon, D and Farber, G. K. (1995). The Structure and evolution of  $\alpha/\beta$  barrel proteins. *FASEB Journal*. 9:497-503.

58.- Rich, J. J and WILLIS, D. K. Direct Submission Submitted (FEB-1997) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

59.- Russell, P. R. (1985). Transcription of the triose-phosphate-isomerase gene of *Schizosaccharomyces pombe* initiates from a start point different from that in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 40 (1), 125-130.

60.- Sambrook, Fritsch, E and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory manual*. CSHL.USA.

61.- Sangari, F. J., Aguero, J and Garcia-Lobo, J. M. (1996). Characterization of a gene cluster involved in erythritol catabolism in *Brucella abortus*. *Sometido*.

62.- Satoh, T., Takahashi, Y., Oshida, N., Shimizu, A., Shinoda, H., Watanabe, M and Samejima, T. (1999). A chimeric inorganic pyrophosphatase derived from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus* has an increased thermostability. *Biochemistry*. 38:1531-1536.

63.- Shaw-Lee, R. L., Lissemore, J. L. and Sullivan, D.T. (1991). Structure and expression of the triose phosphate isomerase (Tpi) gene of *Drosophila melanogaster* *Mol. Gen. Genet.* 230 (1-2), 225-229.

64.- Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R and Wierenga, R. (1996). Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structure studies. *Protein Science*. 5:229-239.

65.- Schuring, H., Beaucamp, N., Ostendorp, R., Jaenicke, R., Adler, E and Knowles, J. R. (1995). Phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* form a covalent bifunctional enzyme complex. *EMBO.J.* 14:442-451.

66.- Smith, D. R. and Robinson, K. Direct Submission Submitted (MAR-1994) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

67.- Stemmer, W. P. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*. 370:389-391.

68.- Swinkels, B. W., Gibson, W. C., Osinga, K. A., Kramer, R., Veeneman, G. H., Van Boom, J. H and Borst, P. (1986). Characterization of the gene for the microbody (glycosomal) triosephosphate isomerase of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 5 (6), 1291-1298.

69.- Taguchi, S., Ozaki, A and Momose, H. (1998). Engineering of a cold-adapted protease by sequential random mutagenesis and a screening system. 64:492-495.

70.- Vartanian, J. P., Henry, H and Wain-Hubson, S. (1996). Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Research*. 24:2627-2631.

71.- Voet, D and Voet, J. (1989). *Biochemistry*. John Wiley and Sons. USA.425-460.

- 72.- Xu, Y and Hall, T. C. (1993). Cytosolic triosephosphate isomerase is a single gene in rice. *Plant Physiol.* 101 (2), 683-687.
- 73.- Walley, S. G. (1973). Refolding of triose phosphate isomerase. *Biochem J.* 173:165-172.
- 74.- Wierenga, R. K., Noble, M. E., Davenport, R. C. (1992). Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J.Mol.Biol.* 224:1115-1126.
- 75.- Wierenga, R. F., Noble, M. E., Vriend, G., Nauche, S and Hol, W. G. (1991). Refined 1.83Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4M ammonium sulphate a comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J.Mol.Biol.* 220:995-1015.
- 76.- Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, A. M., Lambeir, A. M and Wierenga, R. K. (1999). Structural and mutagenesis studies of *Leishmania* triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Engineering.* 12:243-250.
- 77.- Wilmanns, M., Priestle, J. P., Niermann, T and Jansonius, J. N. (1992). Three-dimensional structure of the bifunctional enzyme phosphoribosylanthranilate isomerase: Indolglycerolphosphate synthase from *Escherichia coli* refined at 2°Å resolution. *J.Mol.Biol.* 223:477-507.
- 78.- Zacco, M and Gherardi, E. (1999). The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: A study on TEM-1  $\beta$ -Lactamase. *J.Mol.Biol.* 285:775-783.
- 79.- Zhao, H and Arnold, F. H. (1999). Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of the thermitase. *Protein Engineering.* 12:47-53.
- 80.- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, A. J and Arnold, F. H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotechnology.* 16:258-261.