

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

19

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE
SELECCION PARA LA ACTIVIDAD DE
ALDOLASA**

T E S I S

**DE MAESTRIA EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS**

LIDIA RIAÑO UMBARILA



CUERNAVACA, MOR.

SEPTIEMBRE DEL 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.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo moral que me brindó para realizar esta etapa de mí vida.

A mi comité tutorial, Drs. Xavier Soberón, Guillermo Gosset y Rafael Vázquez, por su orientación y comentarios.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, porque con ellos aprendí y crecí de las más diversas situaciones.

A mis amigos Lizpa, Carlos, Ponchito, Patty Corazón, Sonita, Paty J., Mónica, Lupita, Deyanira, Susa por estar siempre ahí, mil gracias.

A Humberto Flores por su paciencia y comentarios.

A Filiberto Sánchez, Eugenio López y Juana Ferrer por el apoyo técnico para realizar este trabajo.

A Sonia y Jairo por el impulso inicial, de todo corazón gracias.

A los miembros del jurado, Drs. Xavier Soberón, Carmen Gómez, Guadalupe Espín, Lorenzo Segovia y Baltazar Becerril por la revisión de esta tesis.

A la Secretaría de Relaciones Exteriores por la beca del programa "Cuauhtemoc II" SRE/CONACYT/OEA.

Al Dr. Xavier Soberón por haberme permitido trabajar en su grupo y por el apoyo que me brindó para realizar mis estudios de Maestría.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Xavier Soberón Mainero.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
2.1 Ingeniería de Proteínas	2
2.2 Evolución dirigida	3
2.2.1 Métodos para la creación de diversidad molecular	3
2.2.2 Identificación de variantes	4
2.2.2.1 "Screening"	4
2.2.2.2 Selección	4
2.2.2.3 Metodologías empleadas para la generación de los sistemas de selección	7
3. ANTECEDENTES	9
3.1 Migración catalítica	9
3.2 Barril (α/β) ₈ o TIM	9
3.2.1 Aldolasa y TIM	11
3.3 Cepa de selección para la actividad de aldolasa	13
3.3.1 Glicólisis	13
3.3.2 Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa clase I	14
3.3.3 Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa clase II	14
3.3.4 Eliminación de la actividad de aldolasa II	15
4. OBJETIVOS	17
5. MATERIALES Y METODOS	18
5.1. Materiales	18
5.1.1 Cepa empleada	18
5.1.2 Plásmidos	18
5.2 Medios de cultivo	18
5.3. Obtención de los genes de fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa clase I y II	19
5.3.1 Extracción de ADN cromosomal	19
5.3.2 Amplificación de los genes por PCR	20
5.3.3. Clonación en el vector pUC 18	20
5.3.3.1 Ligación	21
5.3.4 Electrotransformación de los plásmidos en células de <i>E. coli</i>	21
5.3.4.1 Preparación de células electrocompetentes	21
5.3.4.2 Electransformación	22
5.3.4.3 PCR de colonia	22
5.3.5. Purificación de plásmidos	22
5.3.6 Secuenciación	24
5.4 "Knockout" o interrupción del gen	24
5.4.1 Construcción para interrumpir el gen <i>fba</i> II	24

5.4.2 Subclonación en pMAK705	24
5.4.3 Obtención de la mutante <i>fba</i> ⁻	24
5.5 Caracterización de la colonia seleccionada	26
5.5.1 Cinética de crecimiento de <i>fba</i> ⁻	26
5.5.2 Complementación de la actividad	27
5.6. Caracterización del sistema de selección	27
5.6.1 Mutantes del gen de la aldolasa clase II	27
5.6.1.1 Mutación dirigida	27
5.6.1.2 PCR Mutagénica	27
5.6.2 Caracterización fenotípica	28
5.6.3 Cinéticas de crecimiento	28
5.6.4 Determinación de la actividad de aldolasa	29
5.6.5 Análisis de proteínas	29
5.7 Reconstrucción de la recuperación de variantes del sistema de selección	29
6. RESULTADOS	30
6.1 Obtención de las genes <i>fba</i> clase I y II	30
6.2 "Knockout" o interrupción del gen <i>fba</i> en el cromosoma de <i>E. coli</i>	31
6.2.1 Construcción para la interrupción del gen <i>fba</i> II	31
6.2.1.1 Deleción e inserción de resistencia a Kanamicina	31
6.2.1.2 Subclonación en pMAK705	31
6.2.2 Obtención de la cepa de <i>E. coli</i> mutante en el gen <i>fba</i> II	32
6.3 Caracterización de la colonia seleccionada	33
6.3.1 Cinética de crecimiento	33
6.3.2 Complementación de la actividad de aldolasa	34
6.4 Sensibilidad del sistema	35
6.4.1 Identificación de la concentración mínima de glucosa que inhibe el crecimiento de <i>fba</i> ⁻	35
6.4.2 Mutantes del gen de la aldolasa Clase II	35
6.4.3 Expresión de la proteína	39
6.4.4 Cuantificación de la actividad de aldolasa	40
5.4.5 Cinéticas de crecimiento	40
6.4.6 Reconstrucción de la recuperación de variantes en el sistema de selección	42
7. DISCUSION	44
7.1 Genes <i>fba</i> I y II	44
7.2 Generación de la cepa de selección. "Knockout" de <i>fba</i> II en <i>E. coli</i>	44
7.3 Sensibilidad del sistema de selección	47
7.4. Reconstrucción de la recuperación de variantes en el sistema de selección	51
8. CONCLUSIONES	54
9. BIBLIOGRAFIA	55

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE SELECCION PARA LA ACTIVIDAD DE ALDOLASA

1. RESUMEN

Con el fin de proveer un mecanismo eficiente para estudiar proteínas con la actividad enzimática de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (Fba), se creó la cepa de selección en *E. coli* JM101 *fba*⁻. Esta enzima es esencial en la vía glicolítica de manera que la pérdida de esta actividad dió como resultado una cepa incapaz de crecer en presencia de glucosa. La complementación homóloga con el gen silvestre permitió el crecimiento celular en diferentes concentraciones de glucosa y también la complementación con variantes de Fba II que tienen la actividad reducida, por lo que se vió que es posible discriminar diferentes niveles de actividad. Esta capacidad para identificar variantes que presentan actividad de aldolasa, es una característica necesaria para los trabajos de migración catalítica y de evolución dirigida de proteínas que se van a realizar en el laboratorio. Si se generan proteínas mutantes sin actividad de aldolasa, las células que lleven estas variantes no podrán sobrevivir en presencia glucosa, por el contrario aquellas proteínas que presenten la actividad (aunque en niveles muy bajos) serán seleccionadas directamente por la sobrevivencia en glucosa.

Se debe considerar que la generación de una proteína con una nueva actividad enzimática es un cambio exigente y poco probable, por lo cual el sistema de selección debe rescatar las variantes que presenten algún nivel de actividad entre las inactivas que serán la mayoría. El resultado final de este trabajo se validará en la medida en que se obtengan bancos de variantes, los cuales serán probados en las condiciones de selección definidas en este proyecto y dependiendo de los resultados, se podrán hacer modificaciones en el proceso de selección.

2. INTRODUCCION

En la actualidad se presenta una demanda creciente para obtener nuevos biocatalizadores, que sean más eficientes y que puedan ser aplicados a nivel industrial. Las proteínas se caracterizan por ser catalizadores muy eficientes, altamente específicos que podrían reemplazar a los procesos sintéticos tradicionales (poco específicos y altamente contaminantes). Desafortunadamente la mayoría de las proteínas naturales no pueden ser empleadas en la industria porque no reúnen las características necesarias (estabilidad, especificidad, etc) para ser usadas en las condiciones de los medios de reacción. Con miras al mejoramiento de sus propiedades se han desarrollado dos estrategias para alcanzar este objetivo: la ingeniería de proteínas y la evolución dirigida.

2.1 Ingeniería de proteínas

La ingeniería de proteínas se basa en la combinación de la información sobre las relaciones entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas, para diseñar cambios específicos (inserciones, deleciones, cambios de aminoácidos) que son necesarios para lograr la propiedad deseada. Estos cambios se introducen a nivel de ADN en el gen que codifica la proteína de interés por medio de mutagénesis dirigida (Blundell T. 1994). Se sustituyen uno o varios aminoácidos simultáneamente en las posiciones que se consideran responsables de características como afinidad por el sustrato y estabilidad entre otras, basados en el conocimiento previo de la proteína. Entre las características que se han logrado mejorar por medio de la ingeniería de proteínas están: la actividad catalítica (Graham *et al.*, 1993); la termoestabilidad (Bryan *et al.*, 1986) y la actividad en solventes orgánicos (Chen and Arnold, 1993).

La posibilidad de rediseñar proteínas se ve limitada por la cantidad de información de una determinada proteína (Harris *et al.*, 1998), la cual por el momento esta disponible sólo para una pequeña fracción de las proteínas existentes. Adicionalmente el nivel de comprensión de las interacciones entre aminoácidos de una proteína y su efecto sobre la función, es hoy en día aun muy pobre. Como alternativa a las limitaciones de la ingeniería de proteínas se desarrolló la evolución dirigida.

2.2 Evolución dirigida

La evolución dirigida es una estrategia para modificar proteínas sin el conocimiento requerido en la ingeniería de proteínas, y se basa en realizar modificaciones al azar, de manera que se imita al proceso evolutivo natural, el cual puede generar nuevas actividades enzimáticas (Arnold, 1998).

La evolución dirigida de una proteína se inicia con la generación de una biblioteca de genes mutados a partir del gen que codifica la proteína de interés. Esto se hace a través de metodologías para crear diversidad molecular (Ver 2.2.1), las variantes obtenidas son clonadas en un vector (biblioteca de genes) y posteriormente son expresadas en un microorganismo hospedero donde se pueden identificar las proteínas que presentan características mejoradas por medio de la **selección** o el **screening** (Kuchner and Arnold, 1997). Las proteínas que se recuperan son sometidas a un nuevo ciclo, éste se repite con el fin de acumular mutaciones que son benéficas para la propiedad deseada.

2.2.1 Métodos para la creación de diversidad molecular

Varias metodologías han sido desarrolladas para la generación de diversidad en las proteínas, la cual se realiza por medio de mutaciones al azar del ADN que las codifica. Algunas de las metodologías son: mutagénesis química (Sweasy and Loeb, 1993); cepas mutadoras de *E. coli* (Greener *et al.*, 1996); oligonucleótidos al azar (Black *et al.*, 1993), PCR mutagénica (Cadwell and Joyce, 1992) y PCR sexual (Stemmer, 1994). Estas dos últimas han sido empleadas con éxito ya que presentan tasas muy altas de generación de mutaciones múltiples al azar (Zhou *et al.*, 1991 - Stemmer, 1994):

- PCR mutagénica: el procedimiento normal de amplificación con la enzima Taq polimerasa puede causar mutaciones con una frecuencia de 1×10^{-4} bases. Las modificaciones de la PCR normal reduce la fidelidad de la síntesis: el incremento de la concentración de $MgCl_2$, la adición de $MnCl_2$, el incremento de la concentración de la Taq polimerasa y el incremento de los tiempos de extensión pueden aumentar la frecuencia de mutación en un 0.66% (Cadwell and Joyce, 1992). De la misma forma el empleo de los deoxinucleósidos trifosfato en diferente proporción o la incorporación de nucleósidos análogos y la presencia de agentes como el Dimetil sulfóxido y el β -mercaptoetanol pueden elevar aun más la frecuencia de mutación (Suzuki *et al.*, 1997).

- PCR sexual “*shuffling*” de DNA: es un procedimiento en el cual un gen o genes con mutaciones puntuales son fragmentados al azar por la digestión con la enzima *Dnasa I*, los fragmentos generados son reensamblados al tamaño normal por medio de una PCR sin oligos, en éste proceso se introducen nuevas mutaciones y los segmentos de ADN son recombinados, el último paso consiste en una PCR normal con oligonucleótidos para obtener el gen completo. La ventaja es que la metodología permite segregar mutaciones, es decir que las mutaciones que no contribuyen al fenotipo no persisten (Stemmer, 1994).

2.2.2 Identificación de variantes

Frecuentemente uno de los factores limitantes en los métodos de evolución dirigida de proteínas es el establecimiento de métodos sensibles para seleccionar las variantes de interés, una vez que se encuentran clonadas en un vector y expresadas en un microorganismo. En la búsqueda de alternativas se han desarrollado metodologías para seleccionar por medio de la búsqueda diferencial (“*screening*”) y de la selección verdadera.

2.2.2.1 “*Screening*”

El término “*screening*” se usa para describir procesos en los cuales las propiedades de las proteínas mutagenizadas de interés se buscan midiendo la característica específica de manera individual a cada variante generada. Es una labor intensa que puede ser usada para analizar bibliotecas pequeñas (Zhao and Arnold, 1997). Por ejemplo el *screening* visual ha servido para la identificación de mutantes con actividades mayores; como en las variantes de la Proteína verde fluorescente (Cramer *et al.*, 1996), en el cual después de 3 ciclos de “*Shuffling*” y el análisis de mil clonas, se encontró que tres cambios de residuos lograron incrementar la fluorescencia 45 veces con respecto a la proteína silvestre.

2.2.2.2 Selección

La selección verdadera es un método en el cual el microorganismo hospedero se cultiva bajo condiciones de crecimiento particulares, que permiten que sólo las variantes que expresan a la proteína con la(s) característica(s) deseada(s) puedan crecer en el medio de selección, ya que la actividad está ligada a la capacidad de la célula de crecer, así que sólo las que presenten algún nivel de actividad suficiente para sobrevivir, son aisladas y

recuperadas. Las técnicas de selección genética se han utilizado extensivamente para aislar por complementación, los genes expresados en hospederos cuyo correspondiente gen ha sido interrumpido (Fastrez, 1997).

Por lo anterior, al diseñar un sistema de selección es necesario determinar si una función particular (actividad enzimática) le confiere una ventaja de crecimiento o sobrevivencia al microorganismo hospedero y si la actividad enzimática puede ser complementada, con la actividad silvestre y con niveles de actividad menores a la silvestre.

El método de selección ofrece la ventaja de ser un método directo y económico ya que permite analizar un mayor número de variantes (bibliotecas de más de 10^6 variantes de la proteína). La selección para el caso de la evolución de proteínas es ventajosa, ya que la complementación genética provee una vía rápida para identificar las clonas que poseen al menos algún nivel de actividad, cosa que generalmente es frecuente en aquellas proteínas que fueron sometidas a una alta tasa de mutagénesis (Arnold and Volkov 1999) y las variantes que no son de interés (las que carecen de actividad) no tienen que ser evaluadas como ocurre en el "screening".

Los ejemplos de sistemas de selección que han sido desarrollados son de enzimas que liberan nutrientes esenciales para el crecimiento, enzimas que catalizan vías metabólicas críticas o enzimas que confieren resistencia a antibióticos. En ellos se han probado bibliotecas de genes mutantes de varias clases de enzimas, con el objetivo de mejorar características enzimáticas y estudiar las proteínas en cuanto a actividad enzimática, mecanismo catalítico y estructura. Estos son algunos ejemplos de evolución de proteínas, usando métodos de selección:

- Recuperación de la actividad enzimática. La enzima triosa fosfato isomerasa es una enzima dimérica, la ruptura en monómeros disminuye la actividad enzimática a nivel basal. Sobre la secuencia del monómero se realizó PCR mutagénica y las variantes fueron clonadas y expresadas en la cepa de selección *E. coli* JM101 tpi^- , se recuperaron 2 mutantes con una actividad 300 veces superior a la monomérica (Juárez, 2000).

- Selección positiva para resistencia a antibióticos. La proteína β -lactamasa tiene actividad hidrolítica sobre varios antibióticos, entre otros contra cefotaxima, pero el nivel de actividad enzimática es bajo. El gen de la β -lactamasa se sometió a tres ciclos de "Shuffling" y dos

ciclos de retrocruzamiento. Se logró obtener mutantes que tenían incrementada 32,000 veces la actividad contra cefotaxima con respecto a la proteína silvestre (Stemmer, 1994).

- Cambiando la especificidad del sustrato. Por medio del “*shuffling*” de ADN de la asparto amino transferasa se crearon variantes que fueron probadas en la cepa de selección de *E. coli* que no tiene activo el gen *ilv* (este defecto no permite la producción de isoleucina, leucina y valina en las células) lo cual impide el crecimiento celular en medio mínimo en ausencia de estos aminoácidos. Con 4 ciclos de “*shuffling*” se logró incrementar la actividad de la enzima para valina y 2-oxovalina en 5 órdenes de magnitud, mientras la actividad natural sobre aspartato se incrementó 30 veces (Yano *et al.*, 1998)

Las desventajas de los sistemas de selección son la falta de versatilidad y sensibilidad con respecto al “*screening*” (que se utiliza para detectar y cuantificar varias actividades enzimáticas). Aunque la mayoría de los métodos de identificación de variantes de proteínas modificadas (*screening* y selección genética) se ha realizado *in vivo*, se presentan algunas limitantes debido a que la célula constituye una unidad de selección en si misma. La generación de una enzima más activa podría ser desventajoso para la célula, ya que ésta posee un complejo sistema de señalización metabólica y mantenimiento de la homeostasis. La acumulación de metabolitos podría arriesgar la sobrevivencia de la célula (Skandalis *et al.*, 1997), así que las enzimas creadas se ajustan para responder a elementos regulatorios de los organismos vivos. No todas las enzimas mutantes con un incremento en la actividad o en la especificidad del sustrato, podrán ser seleccionadas bajo las condiciones naturales. Desafortunadamente el mejoramiento enzimático por múltiples mutaciones no puede ser fácilmente explorado en la naturaleza, a menos que las mutaciones se originen secuencialmente y cada sustitución resulte en un ventaja selectiva, de lo contrario el cambio de un aminoácido puede ser deletéreo por sí mismo, aunque podría incrementar la actividad en presencia de otras mutaciones (Maynard-Smith, 1970).

Otros problemas que originan que la selección no sea 100% efectiva son: las adaptaciones celulares que pueden dar falsos positivos en las condiciones de selección y un bajo nivel de sensibilidad lo cual impide la recuperación de las variantes de menor actividad enzimática.

Las anteriores limitantes no las comparten los sistemas de selección *in vitro*. El sistema recientemente desarrollado de despliegue en fagos, es un ejemplo de ello, en el cual se muta el gen de interés de manera aleatoria o dirigida y el producto es clonado en un gen que codifica para una proteína de la capsida del fago. Esto le permite a la proteína

mutagenizada tener un soporte para plegarse sobre el fago. Posteriormente los fagos son recuperados y la proteína es seleccionada por afinidad a un ligando (se unen las que poseen la característica de interés) (Roberts and Ja, 1999). También ha surgido la técnica de “*screening*” de alta eficiencia en los cuales se busca analizar un número considerable de muestras en tiempos muy cortos, para lo cual se requiere el desarrollo de ensayos específicos y la integración de equipos con alta sensibilidad y rápida detección (ej. técnicas de fluorescencia) (Koltermann *et al.*, 1998), la limitación de esta metodología es de tipo económico.

2.2.2.3 Metodologías empleadas para la generación de sistemas de selección por medio de delección de genes

Gracias a la secuenciación de los genomas y a la tecnología del ADN recombinante es relativamente fácil generar delecciones de un gen o *Knockout* a nivel cromosomal. Sin embargo en *E. coli* las sustituciones y delecciones pueden ser difíciles de obtener (Hamilton *et al.*, 1989). Dos de las metodologías más empleadas se basan en la doble recombinación homóloga y pueden ser empleadas para generar delecciones específicas y reemplazamientos genéticos:

2.2.2.3.1 *Disrupción del gen en un paso:* Un marcador seleccionable se crea, cerca, dentro o en lugar del gen de interés. Esto puede ser hecho por medio de una simple inserción o acompañados de una delección del gen o de una parte. El fragmento de ADN lineal que contiene el gen mutado o deletado, debe estar flanqueado por regiones homólogas al cromosoma. Este es transformado en el microorganismo hospedero y las transformantes que se recuperan en el medio acorde al marcador de selección, serán aquellas en las que se dió la integración del fragmento, lo cual involucra una doble recombinación de los extremos del fragmento lineal con el cromosoma (Fig. 1A). Este método puede llegar a ser ineficiente debido a la actividad de las endonucleasas que degradan el ADN transformado, para lo cual se han utilizado cepas deficientes en RecBCD o por medio de la utilización de sitios *chi* sobre el ADN lineal; la función de estos sitios es bloquear la degradación del ADN y activar la doble recombinación, pero se ha visto que la simple electrotransformación puede mejorar los reemplazos genéticos en muchas cepas de *E. coli* (El Karoui *et al.*, 1999).

2.2.2.3.2 *Disrupción del gen en dos pasos:* éste involucra la integración de un plásmido que tiene marcadores seleccionables y el gen mutante (construido de la misma forma que en un caso anterior con regiones homólogas que flanquean el gen), en el cromosoma

bacteriano, por un proceso de recombinación homóloga; posteriormente se da la resolución de los cointegrados, el cual dependiendo del mecanismo de resolución, genera el tipo silvestre o el reemplazo genético (Fig. 1B). Dado que las secuencias del plásmido son removidas durante la resolución del cointegrado, el reemplazo genético puede ser hecho sin tener que emplear un marcador de resistencia. Para identificar el alelo reemplazado, se recurre al *screening* fenotípico o al análisis por Southern. La clave de este procedimiento involucra el uso de vectores que no pueden replicarse bajo las condiciones usadas para seleccionar el cointegrado. Estos vectores son *ColE1* y sus derivados que no se pueden replicar en mutantes *pol A* (Gutterson *et al.*, 1993; Saarihahti and Palva, 1985), o el replicón sensible a temperatura derivado de pSC101 (Hamilton *et al.*, 1989), o un vector basado en un fagémido (Slater and Maurer, 1993).

Estos esquemas de integración han sido utilizados y se han logrado varios reemplazos exitosos, pero tienen la desventaja de la baja frecuencia de resolución del cointegrado y que no siempre dan el reemplazo deseado (Murphy, 1997).

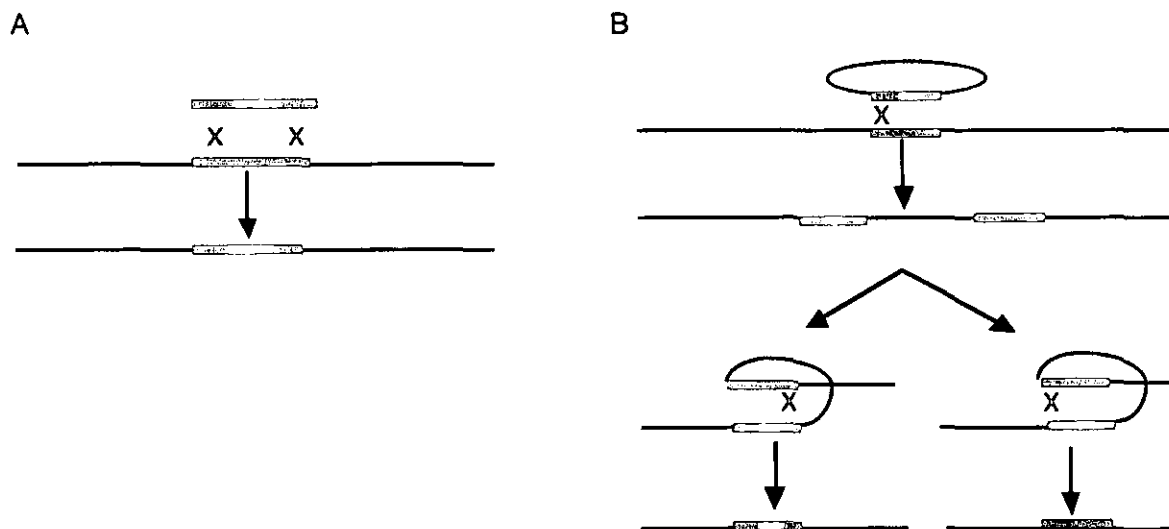


Figura 1. Disrupción genética o delección por reemplazamiento de una secuencia cromosomal. A. En un paso. Utilizando un fragmento lineal que lleva el gen interrumpido con un marcador de selección se da la doble recombinación B. En dos pasos, integración del vector que lleva el gen interrumpido y posterior resolución del cointegrado.

3. ANTECEDENTES

3.1 Migración catalítica

Uno de los intereses del laboratorio se centra en la migración catalítica de actividades sobre una estructura proteica. La migración catalítica consiste en el proceso mediante el cual una proteína con una actividad enzimática determinada, puede ser modificada para dar lugar a una nueva actividad catalítica, preservando alguna similitud con la reacción o especificidad con la molécula precursora. Este proceso se ha dado en la naturaleza desde hace miles de años por eventos de duplicación génica, variación y selección. En la actualidad es posible recrear el proceso de manera acelerada gracias a los avances logrados en los últimos años: la ingeniería de proteínas, la evolución dirigida y los sistemas de identificación de variantes. El ejemplo reciente fue la evolución de la actividad catalítica de la fosforribosil antranilato isomerasa (PRAI) sobre la estructura de la enzima indol glicerol-3-fosfato, donde se logró incrementar la actividad enzimática 30 veces más que la enzima natural (Altamirano *et al.*, 2000). Para este trabajo se tuvo en cuenta los antecedentes de estas enzimas: poseen estructura de barriles $(\alpha/\beta)_8$, son consecutivas en la síntesis de triptófano, están organizadas en un operón, la identidad entre ellas es del 22% y que el producto de PRAI (carboxifenilamino-1'-deoxiribulosa-5'-fosfato) es el sustrato de la IGPS. La migración catalítica pudo ser detectada mediante la cepa de selección de *E. coli* JA300, la cual es deficiente en PRAI y por lo tanto no crece en ausencia de triptófano.

En el laboratorio se está trabajando con proteínas que poseen la estructura del barril $(\alpha/\beta)_8$, el cual por sus características funcionales y evolutivas constituye un modelo interesante para comprender los procesos de evolución natural que han dado origen a nuevas actividades enzimáticas.

3.2 Barril $(\alpha/\beta)_8$ o TIM

El Barril $(\alpha/\beta)_8$ es uno de los plegamientos más versátiles presentes en la naturaleza (Hegyri and Gerstein, 1999), ya que es la estructura más frecuente y regular de las proteínas, ya que esta presente en 5 de las 6 clases de enzimas (E.C.). El dominio (α/β) consiste de 8 β -plegadas paralelas que forman el núcleo del barril, rodeadas por α -hélices todas fuera del barril; estos elementos de estructura secundaria se unen entre sí por medio de asas. La primera enzima descubierta con esta estructura fue la triosa fosfato isomerasa (TIM)

(Banner *et al.*, 1975) en la que la cadena β_1 se une por medio de puentes de hidrógeno con la cadena β_2 y β_8 , frecuentemente hay una α hélice entre cada cadena β . Aunque el plegamiento es un barril, la estructura no es circular a través de la sección, la mayoría de las proteínas son elípticas y los residuos del sitio activo están localizados invariablemente al final del carboxilo terminal de las cadenas β o en las asas subsecuentes (Reardon and Farber, 1995). Se ha sugerido que la versatilidad de esta estructura, se debe a que los grupos funcionales han sido reclutados de los 8 motivos estructurales α/β que han podido evolucionar independientemente. Adicionalmente las asas pueden variar extensivamente sin truncar la estabilidad del corazón estructural.

Al estudiar las regiones conservadas de varios barriles se encontró un sitio común de unión a fosfato, que involucra la región entre la cadena β_7 y la hélice α_8 (Farber and Pestko 1990; Bork *et al.*, 1995). La estructura básica puede tener dominios adicionales o estructura secundaria reconocible en las asas que conectan las cadenas β con las α -hélices. Con base en estas características estructurales adicionales y en la forma del barril, las proteínas se han clasificado en 6 familias (Reardon and Farber, 1995).

Por las anteriores características, estas proteínas han sido objeto de estudios para tratar de entender su evolución. Se han propuesto diferentes historias evolutivas del barril TIM como son:

- Evolución convergente a un plegamiento estable, dada las características de estabilidad del motivo estructural, muchas proteínas ancestrales con diferentes secuencias pudieron converger a este plegamiento (Doolittle, 1994). Si esto fuera posible se podría utilizar los patrones de los residuos conservados para predecir la estructura, y entender la vía del plegamiento de los barriles.
- Evolución divergente, las proteínas $(\alpha/\beta)_8$ pudieron haber descendido de un ancestro común, ya que la estructura tridimensional evoluciona más lentamente que la estructura primaria y la falta de identidad entre las secuencias (15 % de identidad entre las proteínas de esta familia), puede ser explicada por la edad de la enzima ancestral (Bork F, 1995; Pestko 1990 y Farber 1993). Esto se fundamenta en las propiedades altamente conservadas entre los barriles, como son la localización del sitio activo, lo cual puede ser producto de duplicación génica y especialización de las familias, en este caso la conservación de aminoácidos particulares puede ser el resultado de un accidente histórico,

fosfato, y la triosa fosfato isomerasa (Tpi o TIM) interconvierte de manera reversible la dihidroxiacetona-3-fosfato a gliceraldehido-3-fosfato (Fig. 3).

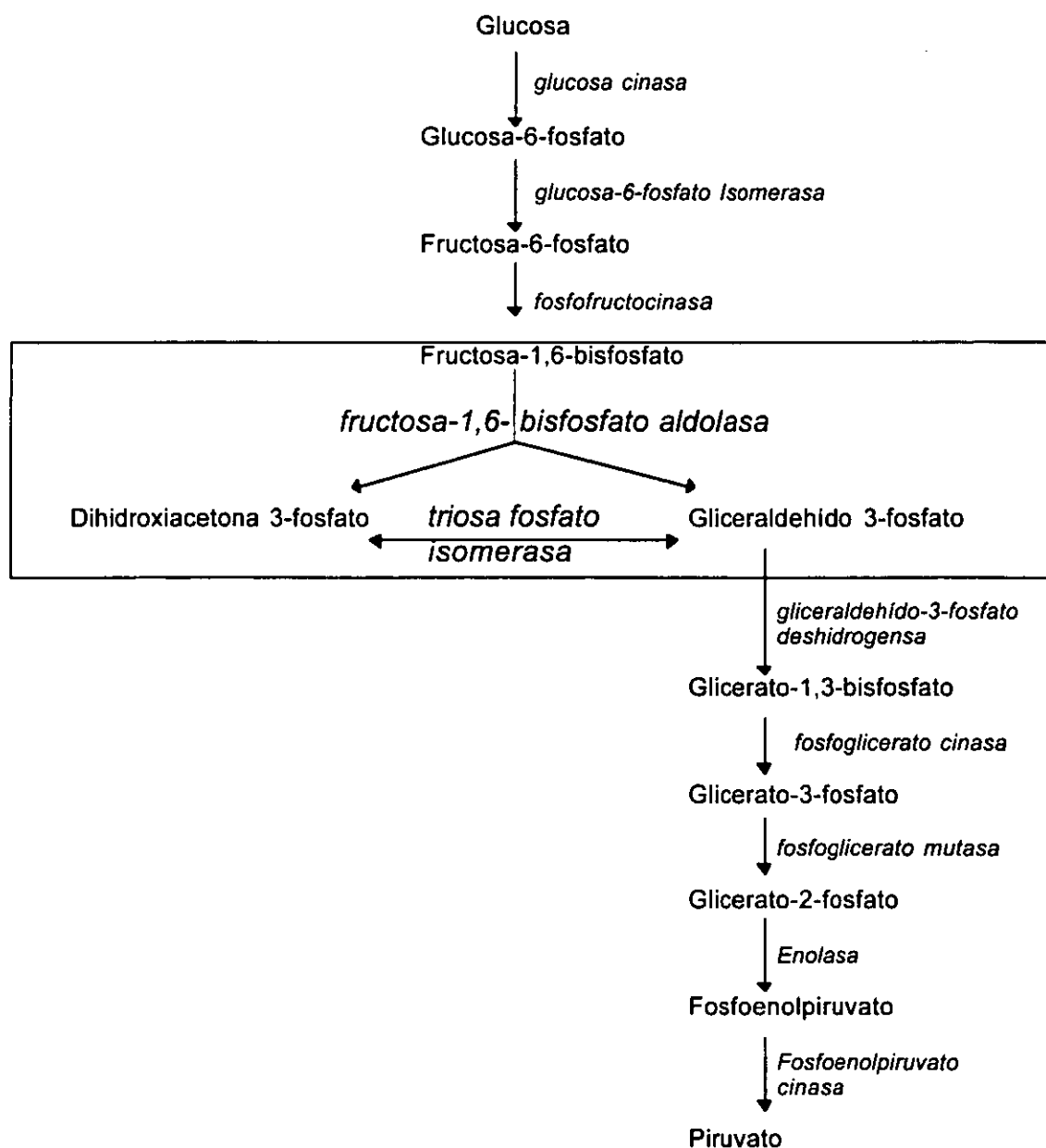


Figura 3. Enzimas que participan en la vía Glicolítica. En el recuadro se encuentran indicadas la enzimas de interés en este trabajo, la Fba y la TIM.

A nivel evolutivo es de considerar la evolución misma de la vía, en el contexto de este trabajo la teoría de la evolución reversa (Horowitz, 1945) es un esquema interesante, ya que propone la formación de la vía en reversa paso a paso en dirección contraria a la ruta metabólica. Como es el caso del grupo de enzimas consecutivas formado por la N-fosforribosil antranilato isomerasa, indol-glicerol-3-fosfato cinasa y la subunidad α de la

triptofano sintasa, las cuales son barriles $(\alpha/\beta)_8$ (Nichols, 1996). Esto podría ser el resultado de eventos tempranos de duplicación génica. Teniendo en cuenta este argumento, las características de las enzimas y la migración catalítica ya lograda por Altamirano *et al.* (2000), es posible proponer la migración catalítica o interconversión entre TIM y Fba por métodos de Ingeniería de proteínas y de evolución dirigida. Para realizar esta migración se requiere de un método para la identificación de variantes de TIM que presenten la actividad de aldolasa, lo que permitirá estudiar las relaciones evolutivas y funcionales de éstos TIMs. Se decidió la construcción del sistema de selección en *E. coli* por las características anteriormente señaladas: la economía y la posibilidad de analizar un buen número de variantes simultáneamente.

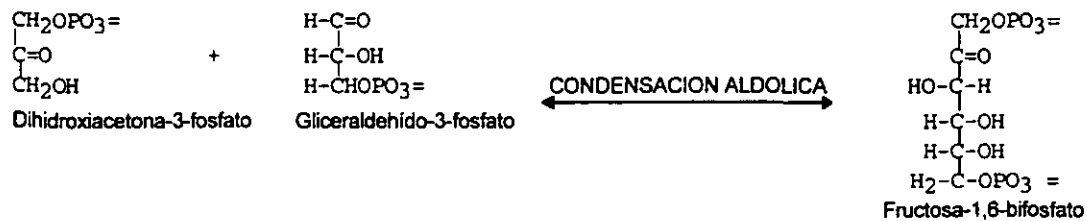
3.3 Cepa de selección para la actividad de aldolasa

Trabajar con *E. coli* tiene la ventaja de que es el microorganismo con mayor información disponible acerca de su metabolismo, regulación y secuencia genética, lo cual facilita la labor de manipulación, así como la comprensión de los posibles efectos de una mutación genética. El sistema de selección se genera por la eliminación de la actividad a través de la disrupción o "knockout" del gen de Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (*fba* o *ald*), para hacerlo es necesario tener en cuenta las características de la enzima, su participación en la vía glicolítica y en el metabolismo de *E. coli*.

3.3.1 Glicólisis

La glicólisis es la principal ruta metabólica para la obtención de energía (ATP) mediante la degradación de glucosa. La vía también se encarga de suministrar esqueletos para las reacciones biosintéticas, tales como la formación de ácidos grasos. Esta vía puede ser alimentada por varios sustratos como glucosa (principalmente) y glicerol, los cuales ingresan a la célula de la siguiente forma: la glucosa entra por medio del sistema de fosfotransferasa de azúcar, el cual transporta y fosforila simultáneamente los sustratos (azúcares). La glucosa fosforilada ingresa en el segundo paso de la vía glicolítica. El glicerol atraviesa la membrana citoplasmática por un mecanismo de poro no saturable, dentro es fosforilado por la enzima glicerol cinasa y pasa a glicerol-3-fosfato, el cual es convertido en dihidroxiacetona-3-fosfato, por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y de esta forma ingresa a glicólisis.

En la vía glicolítica la Fba cataliza la ruptura reversible de la fructosa-1,6-bisfosfato a dos productos, dihidroxiacetona-3-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato.



Se han reconocido dos tipos de aldolasas por el mecanismo de acción:

TIPO I forma un intermediario base de Schiff en el sitio activo con el sustrato donador (acetona), el cual adiciona estereoespecíficamente al aceptor (aldehído).

TIPO II usa un ión metálico como cofactor (Ca^{2+} , Fe^{2+} , o Zn^{2+}), el cual actúa como un ácido de Lewis en el sitio activo.

La mayoría de los organismos presentan uno de los dos tipos de aldolasas, una de las excepciones es *E. coli* donde se reconoció la presencia de los dos tipos de aldolasas (Stribling and Perham, 1972), al crecerla en diferentes fuentes de carbono. En glucosa se identificó a la aldolasa clase II, mientras que en piruvato y lactato se encontraron las dos clases de aldolasas. Esta es la razón principal para sugerir que la Fba clase I está involucrada en gluconeogénesis, mientras que la Fba clase II está involucrada en glicólisis; de tal forma que la clase II se expresa constitutivamente, mientras la clase I es inducida por sustratos gluconeogénicos.

3.3.2 Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa clase I

En *E. coli* la Aldolasa clase I posee 349 aminoácidos con un peso molecular de 36 Kda. Los valores de K_{cat} y K_m corresponden a 13 m^{-1} y $20 \mu\text{M}$. La enzima presenta un incremento de la actividad de aproximadamente 15 veces la K_{cat} en presencia de citrato. Por el contrario la actividad decae a un 0.7% de la actividad inicial en presencia de NaBH_4 . El sitio activo para la formación de base de Schiff corresponde a la lisina 236 (Thomson *et al.*, 1998).

3.3.3 Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa clase II

La Fba II es una enzima dimérica, en *E. coli* cada monómero tiene 359 aminoácidos, con un peso molecular de 40Kda. La enzima utiliza 2 átomos Zn^{2+} (uno por cada monómero) para la

actividad, los cuales entran en contacto con los residuos His110, His266, e His264 empleados para unir al metal (Berry and Marshall 1993), por esta razón la enzima es inhibida por EDTA. En *E. coli* la *fba* II es más activa que la I con una K_{cat} de 490 min^{-1} y una K_m de $190 \mu\text{M}$.

El gen *fba* II forma parte de un grupo de genes junto con *pgk* y *gapB* (Fig. 4), que corresponden a fosfoglicerato cinasa y a gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa B, éste gen difiere del reportado (*gapA*) y se presume su participación en gluconeogénesis (Perham 1990).

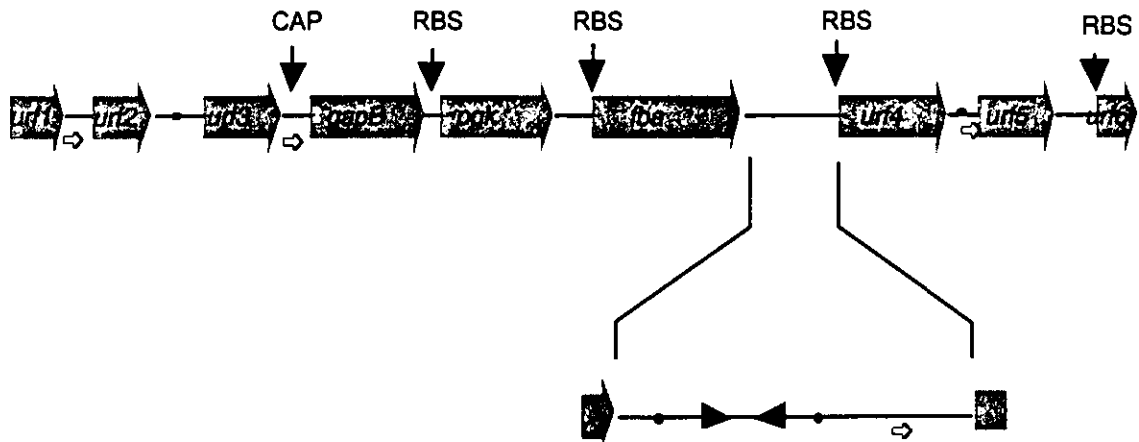


Figura 4. Mapa de la región del cromosoma que contiene al gen de la Aldolasa clase II. • Terminador de transcripción, ⇨ Predicción de un promotor, ▶ ◀ sitios REP, RBS sitios de unión a ribosoma, CAP sitio de unión de la proteína activadora de catabolitos. Tomado de Richard Perham. 1990. The fructose-1,6-bisphosphate aldolase: same reaction, different enzymes. Isoenzymes Biochem. Soc. Trans. 18.185-187

3.3.4 Eliminación de la actividad de aldolasa

La eliminación de la actividad de aldolasa en la vía glicolítica hace que la transformación de glucosa en energía no sea exitosa y que las células carentes de esta actividad no puedan sobrevivir en presencia de glucosa. Se han reportado mutantes de *fba* II en *E. coli*, las cuales son incapaces de crecer en medios ricos en glucosa, debido posiblemente a la acumulación de intermediarios fosforilados, especialmente fructosa-1,6-bisfosfato (Singer *et al.*, 1991; Frankelt, 1987; Davis *et al.*, 1984). Sin embargo, aún no se ha determinado el mecanismo de toxicidad. Este fenotipo sugiere que no es necesario eliminar la aldolasa clase I, debido a que la función está dirigida a gluconeogénesis. La necesidad de deletar el

gen de *fba I* está ligada al ruido de fondo que pudiera generar en la selección de variantes con actividad de aldolasa.

El hecho que otros sustratos como glicerol puedan alimentar la vía en pasos posteriores a la aldolasa permiten que la producción de energía pueda ser suplida sin comprometer la sobrevivencia de la célula. Las mutantes de *fba II* pueden crecer en glicerol (Cooper, 1969), esta fuente alternativa de carbono permitirá recuperar y mantener viable a la cepa de selección.

El sistema de selección (carente de la actividad de aldolasa clase II) deberá permitir la complementación de la actividad de aldolasa, de modo que las células al ser transformadas con el gen silvestre podrán metabolizar la glucosa y sobrevivir en su presencia.

Aunque existen dos mutantes reportadas en algunos trabajos; la JM 2087 (Casadaban and Cohen, 1979) que es *fba⁻* y la KM13 (Berry and Marshall, 1993) derivada de la anterior, no hay información disponible de éstas, sobre el tipo de mutación, posibilidad de reversión y caracterización de las cepas. Por estas razones es más seguro construir y caracterizar la cepa de selección de la actividad de aldolasa, así como determinar la capacidad de detectar niveles de actividad de aldolasa muy baja.

4. OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto es desarrollar un sistema de selección para la actividad de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa en *E.coli* que permita identificar diversos niveles de esta actividad.

Los objetivos particulares del trabajo son

- Obtener los genes fructosa-1,6-bisfosfato aldolasas clases I y II de *E.coli* y clonarlos.
- Inactivar el gen de la *fb*a II por la introducción del gen de resistencia a kanamicina
- Obtener una cepa de *E. coli* sin la actividad de la aldolasa (Clase II) a través de la doble recombinación entre el gen inactivo (*fb*a II interrumpido por kanamicina) y el gen cromosomal
- Determinar las condiciones óptimas para la selección y el nivel de sensibilidad del sistema por medio de la generación de mutantes de aldolasa.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Cepa empleada

E. coli JM101 genotipo: *supE thi Δ (lac-proAB)*, $F'\{traD36 proAB^+ lacI^{\rho} lacZ\Delta M15\}$ (Messing, 1979).

5.1.2 Plásmidos:

pUC18 resistencia a ampicilina (Amp) (Messing 1983, Norrander *et al.*, 1983).

pBSL98 resistencia a Kanamicina (Km)

pMAK 705 resistencia a Cloranfenicol (Cm) Hamilton *et al.*, 1989).

5.2 Medios de cultivo

- Medio Luria-Bertani (LB) sólido y líquido (Sambrook ,1989), suplementado con los antibióticos: kanamicina (25 $\mu\text{g/ml}$), ampicilina (200 $\mu\text{g/ml}$), cloranfenicol (75 $\mu\text{g/ml}$), adicionados de acuerdo a las necesidades de la selección.

- Medio Mínimo :

Sales 50X		5.0 ml
Fosfato de potasio ácido (KH_2PO_4)	5.0 g	
Fosfato de potasio básico (K_2HPO_4)	17.5 g	
Agua d c.s.p.	100.0 ml	

Sulfato de magnesio (MgSO_4) al 1%		2.5 ml
Cloruro de amonio (NH_4Cl) 1M		2.5 ml
Cloruro de sodio (NaCl) al 5%		2.5 ml
Tiamina 5mg/ml		5.0 μl
Casaminoácidos al 20%		5.0 ml
Agua csp		250.0 ml

(Modificado de Irani y Maitra, 1977)

* El medio mínimo sólido se prepara agregando agar a una concentración final del 1.5%

*Como fuente de carbono se usa glicerol al 0.5% o una mezcla de glicerol al 0.5% y glucosa a distintas concentraciones o solo glucosa.

5.3 Obtención de los genes de Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa I y II de *E. coli*

Con base en las secuencias reportadas se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes de las fructosa-1,6-bisfosfato aldolasas I y II, incluyendo 200 pb más en cada uno de los extremos de los genes, los oligos llevan secuencias de restricción. Las secuencias de los oligonucleótidos sintetizados en la Unidad de Síntesis de Olinucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM son:

Gen *fba* I

- **Upl** : 5' TCA TCA **GGA TCC** ACA GCT TTGC 3' sitio *Bam*HI
- **Lowl** : 5' AGA CGC ATA **AGC TTC** GCA TCA 3' sitio *Hind*III

Gen *fba* II

- **II A** : 5' GAG CAC GGT **ACC TTT** CAT ACT CTA 3' sitio *Kpn*I
- **II B** : 5' ATA CTG **GAT CCG** ACA GAT ATC AAT G 3' sitio *Bam*HI

Los sitios de restricción son señalados en negritas.

El tamaño de los genes es de 1,079 pb para la *fba* II y de 1,047 pb para la *fba* I; con las secuencias adicionales el tamaño de cada fragmento es de 1,500 pb aproximadamente (Fig 5A).

5.3.1 Extracción de ADN cromosomal

Un cultivo de 5 ml *E. coli* cepa JM101 en fase estacionaria, se centrifuga en 2 tubos de microcentrifuga de 2 ml a 10,000 rpm por 2 min. y se descarta el sobrenadante. El proceso se repite dos veces para procesar todo el cultivo. La pastillas se resuspenden en 1 ml de amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl pH 7.4 - 7.5, 1 mM de EDTA pH 8.0). Se vuelve a centrifugar 30 segundos, se descarta el sobrenadante y se repite la operación. Las pastillas se resuspenden en un ml de TE y se le agregan 4 µl de una la solución de Rnasa (10 mg/ml), 50µl de SDS al 10% y 50µl de proteinasa K (2.5 mg/ml). La mezcla se incuba a 37°C durante 1 hora.

El lisado claro resultante se pasa 3 veces a través de jeringa insulínica, se hace una extracción con 0.4 ml de fenol saturado y 0.4 ml de cloroformo. La fase acuosa se extrae tres veces más con fenol-cloroformo para eliminar la capa de detritus que se forma en la interfase. Después de agregar fenol-cloroformo se agita por 12 segundos y se centrifuga por 10 min. a 14,000 rpm. La fase acuosa se extrae con 2 volúmenes de cloroformo (aproximadamente 1 ml). Después de agregar el cloroformo se agita por 12 segundos y se

centrifuga por 10 min. a 14,000 rpm. A la fase acuosa se le adiciona etanol absoluto (aproximadamente 1 ml) se agita y se centrifuga, la pastilla se lava con etanol al 70%, posteriormente se seca y se resuspende en 100 μ l de agua destilada desionizada (dd). El ADN obtenido se verifica por medio de digestión: 2 μ l de ADN, 0.5 μ l de Buffer B (Boehringer Mannheim), 20 U de *EcoRI*. Se completa a 5 μ l con H₂O dd y se incuba a 37 °C toda la noche.

5.3.2 Amplificación de los genes por PCR

Las condiciones utilizadas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes *fb*a I y II son las siguientes:

- Agua dd c.s.p.	100 μ l
- Buffer de PCR 10X	10 μ l
- Cloruro de Magnesio 25 mM	8 μ l
- Oligo A 20 pmol/ μ l	2 μ l
- Oligo B 20 pmol/ μ l	2 μ l
- ADN cromosomal 250 ng/ μ l	2 μ l
- ADN polimerasa	2 μ l (2.5u)

La amplificación se hizo en un Robocycler™ 40 (Stratagene) de la siguiente manera:

- Ciclo a 95 °C por 3 min.
- 25 ciclos (95°C 1 min, 50°C 1 min. y 72°C 1.5 min.)
- Ciclo a 72°C 10 min.

Estas condiciones son las adecuadas para amplificar los dos genes de aldolasa de *E. coli*. También son útiles para amplificar los fragmentos clonados en el vector, directamente de las células (5.3.4.3) o del vector purificado.

5.3.3 Clonación en el vector pUC18

Los productos de PCR se mezclan con 500 μ l de butanol, se agitan vigorosamente y se centrifugan a 13,000 rpm por 10 min., se elimina el butanol y la pastilla se lava con etanol al 70 %, se centrifuga nuevamente y se descarta el etanol. La muestra se seca al vacío en un aparato Savant™ y luego se resuspende en 100 μ l de agua. Posteriormente los productos de PCR se digieren con las respectivas enzimas de restricción: la digestión de *fb*a II con las enzimas *KpnI* y *BamHI* (10 U de cada una) en Buffer L (Boehringer Mannheim), la *fb*a I con las enzimas *BamHI* y *HindIII* (10 U de cada una) en Buffer B (Boehringer Mannheim). Las digestiones se realizan por 2 horas a 37°C.

El vector pUC18 se digiere con las mismas enzimas para generar los extremos compatibles con cada inserto. Después de digerir los vectores, se trataron con fosfatasa alcalina (Sambrook, 1989), para evitar el religado sobre sí mismos. Los genes y los vectores se purifican por gel de agarosa al 1% (Sambrook, 1989). Cada banda del tamaño indicado se corta del gel con una navaja y se pasa por una jeringa para romper la estructura del gel de agarosa, luego se le adiciona 0.8 ml de fenol saturado con Tris-HCl (10 mM pH 8) y se deja 10 min. a -70°C; se centrifuga a 14,000 rpm durante 10 min. y se recupera el sobrenadante. Se le hace una extracción con fenol/cloroformo 1:1. La fase acuosa se recupera y se precipita con butanol, posteriormente se lava con etanol, de la misma forma que se limpian los productos de PCR.

5.3.3.1 Ligación

Los insertos se ligan al vector en una proporción molar 8:1 (inserto:vector) con ligasa T4, Boehringer Mannheim, y amortiguador de ligasa (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de ATP, 1mM de DTT) en un volumen de 15 µl a 16°C, toda la noche. A las reacciones de ligación se les elimina el agua con el mismo procedimiento de los productos de PCR, se resuspenden en 10 µl agua; 2 µl de la ligación se electroporan en células electrocompetentes JM101 de *E. coli*.

5.3.4 Electrotransformación de los plásmidos en células de *E. coli*

5.3.4.1 Preparación de células electrocompetentes:

El preinoculo se prepara en 15 ml de medio LB con una de las colonias más grandes (JM101), se deja crecer a 37 °C toda la noche en agitación. Se toman 10 ml y se inocula 1 litro de medio LB. Se deja por 3:15 horas a 37 °C en agitación hasta alcanzar una OD 600 de ≈0.9 (densidad óptica a 600nm). El cultivo se pasa a tubos de centrifuga de 250 ml y se deja en hielo por 20 min. Se centrifuga a 4.000 rpm por 10 min. a 4 °C. Se retira el sobrenadante dejando 5 ml del medio, se resuspende suavemente. Se adicionan 125 ml de glicerol frío al 10% y las células se colocan en dos tubos de 250 ml. Se centrifuga a 4.000 rpm por 10 min., se tira el sobrenadante y se resuspende cada frasco en 1ml de glicerol frío al 10 % y 1 ml de medio GYT (10 % de Glicerol, 0.125 % de Extracto de levadura, 0.25% de Triptona. Esta solución se esteriliza por filtración). Se reúne el contenido de las botellas (aproximadamente 4 ml), se alicuota en fracciones de 60 µl en tubos eppendorf estériles de 500µl. Se almacenan a -70°C.

5.3.4.2 Electrotransformación

Se toman 2 μ l de producto de la ligación y se colocan en un tubo con células competentes de JM101 de *E.coli*. La mezcla se transfiere a una celda para electroporación con una separación de electrodos de 1 mm y se electrotransforma a un voltaje de 1.8 volts, 20 Ω , 400 mA. Las células se transfieren a un ml de medio SOC (triptona al 2 %, extracto de levadura al 0.5%, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 20 mM de glucosa, 10 mM de MgCl₂ y 10 mM de MgSO₄) y se incuban en agitación durante 1 h. a 37°C. Luego de este lapso de tiempo se toman 200 μ l y se siembra en cajas con medio LB sólido con Amp.

5.3.4.3 PCR de colonia

La PCR de colonia se realiza de la forma descrita en 5.3.2, el ADN en este caso proviene de las células de una porción de colonia, que se toma con un palillo estéril y se resuspende en la mezcla para PCR. El ciclo inicial se incrementa a 10 min a 95°C. La amplificación de las respectivas bandas es resultado positivo. Las colonias que amplifican el fragmento correspondiente al gen, se siembran en 5 ml de medio líquido LB-Amp para purificar el plásmido.

5.3.5 Purificación de los plásmidos

Se realiza por medio del Kit para purificación de plásmidos de Boehringer Mannheim (High Pure Plasmid Isolation Kit), en el cual las células se lisan (medio alcalino) y el RNA es removido con la enzima RNasa. Posteriormente los restos celulares se remueven por centrifugación y los plásmidos presentes en la fracción soluble se retienen al pasar por las columnas, al ADN se le eliminan sales, proteínas y otras impurezas celulares por varios pasos de lavados. El último paso consiste en la recuperación, que se hace al eluir con agua o un buffer con bajo contenido de sales. Una vez purificados los plásmidos se digieren con enzimas de restricción y se analiza por electroforesis en gel de agarosa, las bandas deben corresponder al tamaño de los fragmentos que contienen los genes y al vector lineal.

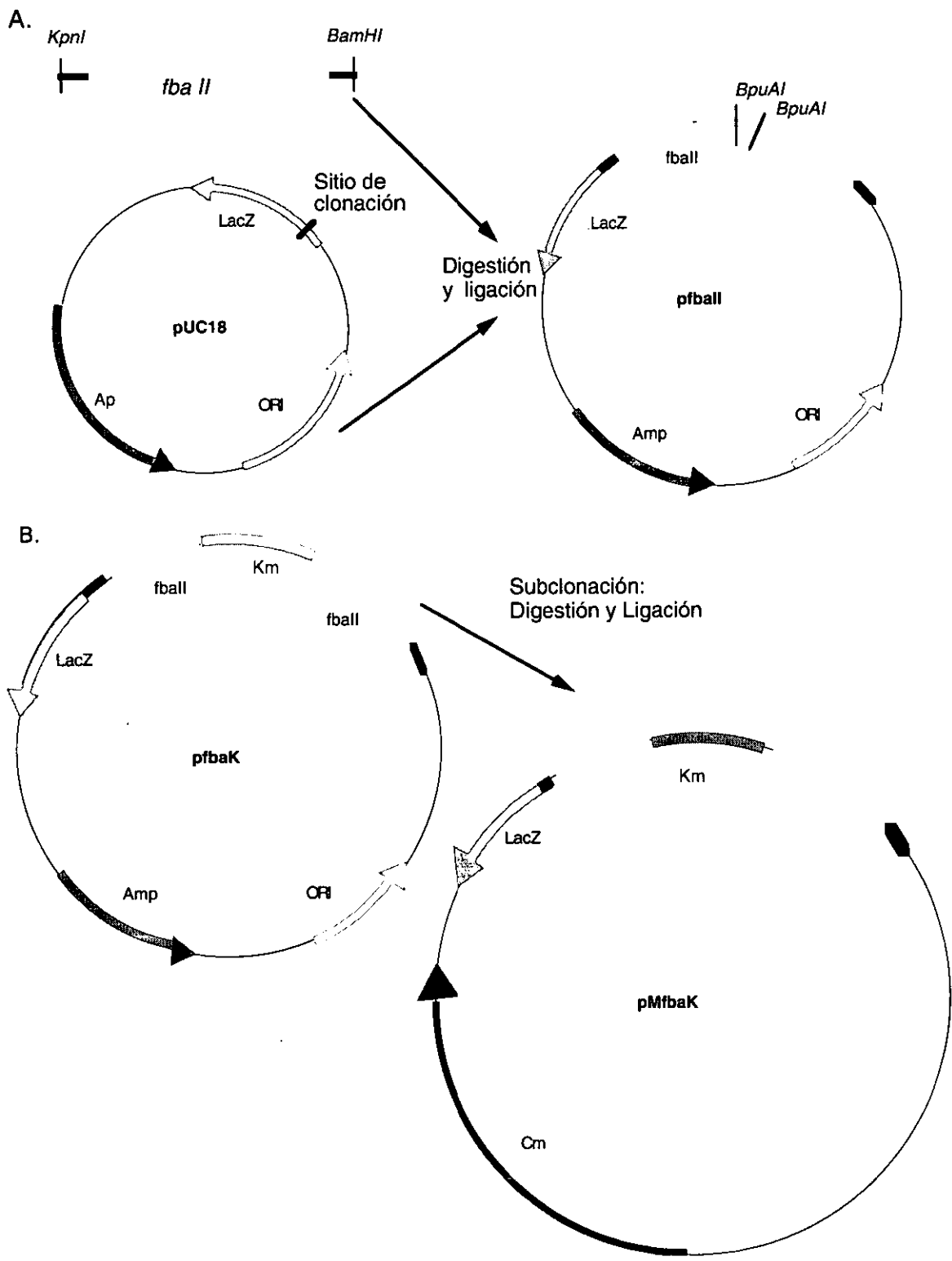


Figura No 5. Construcciones realizadas A. Clonación del gen *fba II* en pUC18 (la construcción se realizó de la misma forma para el gen *fba I*) B. Interrupción del gen *fba II* y subclonación en el vector pMAK705.

5.3.6 Secuenciación

La secuencia de los genes de los plásmidos purificados se realiza en un secuenciador automático Perkin-Elmer 377-18. El cual detecta la fluorescencia de 4 diferentes fluoróforos usados como terminadores de la reacción, para identificar las reacciones de extensión de las bases A, G, C, y T. Cada fluoróforo se excita a diferentes longitudes de onda cuando se expone a la luz laser, así las cuatro emisiones pueden ser detectadas y distinguidas en un solo carril del gel (ABI PRISM, 1995).

5.4 “Knockout” o interrupción del gen

5.4.1 Construcción para interrumpir el gen *fba* II

El gen de resistencia a kanamicina se clona en el gen la aldolasa II (del *pfba* II) Fig. 5B. El plásmido se digiere con *Bpu*AI y se rellena con Klenow (Sambrook, 1989). Este plásmido se liga con el gen de resistencia a kanamicina obtenido del plásmido pBSL 98 por digestión con *Mlu*I y relleno con la enzima Klenow. Luego se transforma en *E. coli* y se selecciona en medio LB Amp-Km. Se verifica por PCR de colonia la presencia del gen interrumpido. El fragmento amplificado es de 2,800 pares de bases (1,500 del gen *fba* II y 1,300 del gen de resistencia a kanamicina). Este plásmido se denomina pfbak.

5.4.2 Subclonación en pMAK705

El inserto con el gen interrumpido se amplifica del plásmido pfbak por PCR, utilizando Taq polimerasa y los oligos que hibridizan a las regiones aledañas al gen. Se digiere y clona en el plásmido termosensible pMAK 705 (con resistencia a cloramfenicol) previa digestión con las mismas enzimas Fig 5B. Con este vector (pMfbak) se transforman por electroporación células de *E.coli* JM101 y se seleccionan en medio sólido LB kanamicina-cloranfenicol a 30°C. La transformación se verifica por PCR de colonia y digestión de los plásmidos purificados, donde se libera el vector de 5,500 pb y el inserto 2,700.

5.4.3 Obtención de la mutante *fba*⁻

El esquema de la figura 6 resume el proceso. Se transforman células de *E. coli* JM101 con el plásmido pMfbak. Estas se cultivan en 0.5 ml de medio mínimo con glicerol sin antibiótico por 4 h. a 30°C, al final de este periodo se lleva el cultivo a un volumen final de 10 ml con el

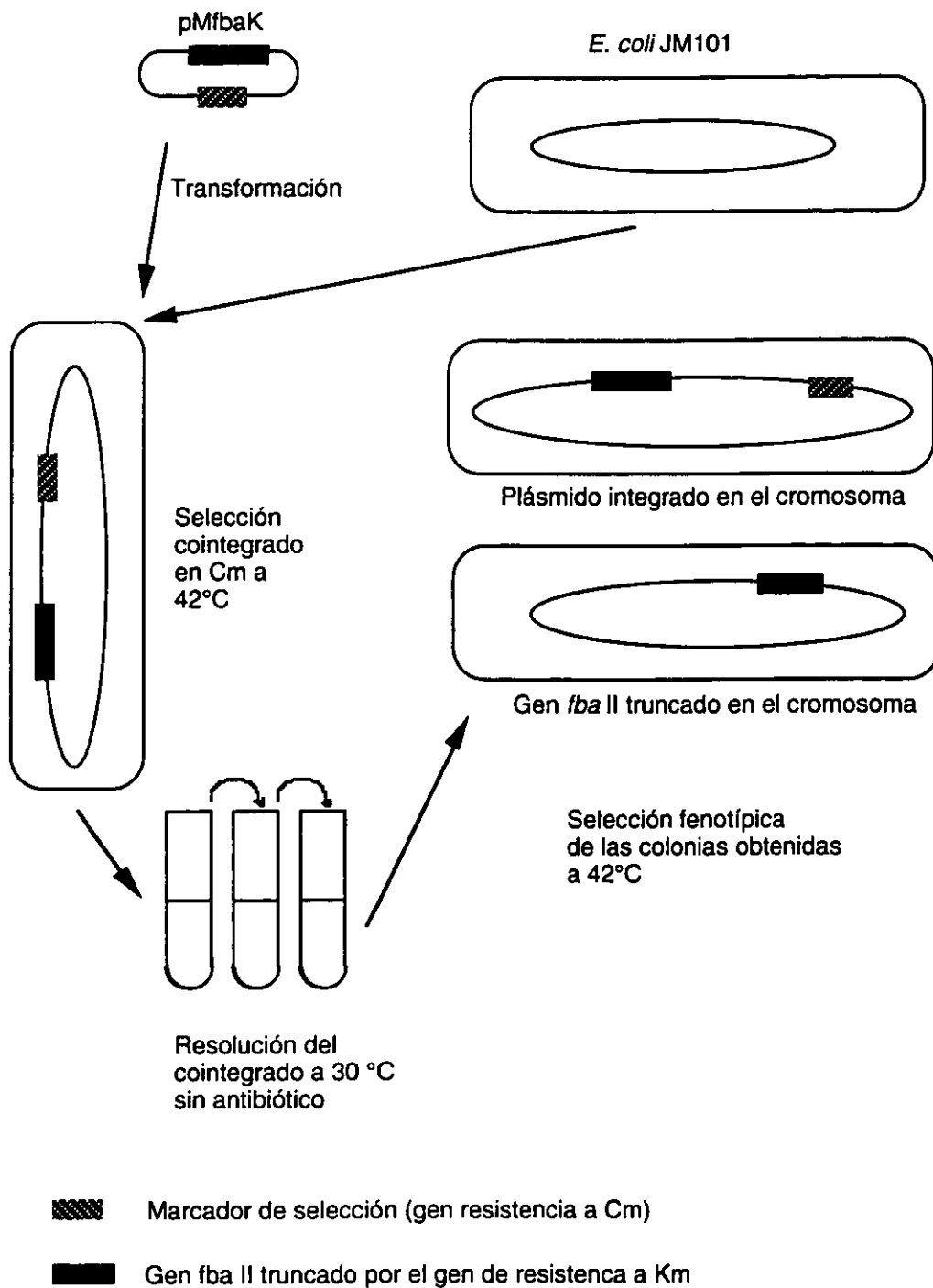


Figura 6. Esquema del protocolo para intercambiar el gen *fba II* truncado del plásmido en el cromosoma de *E. coli*.

mismo medio, se incuba por un periodo de 6 horas a 30°C, luego a 37°C toda la noche. De este cultivo se realizan diluciones del orden 10^6 y se platican 300 μ l en cajas de medio rico con glicerol-Km, las cuales se precalientan a 42°C y se incuban a la misma temperatura. De las colonias seleccionadas a 42°C se toman varias colonias (4 a 10), las cuales se inoculan en 10 ml del mismo medio, se dejan crecer por 12 h. a 30°C, y se inoculan nuevamente transfiriendo 0.1 ml a 10 ml del medio, esto se hace 3 veces. De estos cultivos se realizan diluciones del orden 10^6 y se platican 300 μ l en cajas con medio mínimo glicerol suplementado con km, y se incuba a 42 °C. De las colonias obtenidas se siembran en los medios: mínimo glicerol con Km, Km-Cm, y Cm a 30, 37 y 42°C. Las siembras se realizan diariamente por un periodo de 3 días, para identificar el fenotipo: crecimiento en Kanamicina (ya que el gen de resistencia debe estar integrado en el cromosoma) e inhibición del crecimiento en Cloranfenicol (debido a la pérdida del plásmido).

La mutación en el cromosoma se confirma por PCR empleando como templado ADN cromosomal purificado (obtenido con el protocolo descrito inicialmente) y los oligos que flanquean el gen de aldolasa clase II.

Las células electrocompetentes de *fb^{a-}* se prepararon siguiendo el protocolo descrito en 5.3.4.7, pero empleando el medio mínimo líquido con glicerol y kanamicina para crecer las células y el medio GYT se reemplaza por medio GT (10% glicerol, 0.25% triptona).

5.5 Caracterización de la colonia seleccionada

5.5.1 Cinéticas de crecimiento de *fb^{a-}*

Las cinéticas de crecimiento cepa *fb^{a-}* en medio líquido con glicerol se realiza en concentraciones de 1.5, 1.0 y 0.5%; también en medio líquido con glicerol 0.5%, al cual se le adiciona glucosa en las siguientes concentraciones 0.2 0.1 y 0.05%. Se emplean tres colonias de la cepa *fb^{a-}* y tres colonias de la cepa JM101 de las cuales se obtienen preinóculos en medio mínimo con glicerol durante una noche. Los medios (en tubos con 3 ml) se inoculan con el volumen de células necesario para que todas la muestras presenten la misma O.D. a tiempo 0 (O.D. 0.03 a 600 nm). Se toman lecturas cada hora en el fotocolorímetro Spectronic 2000 a una longitud de onda de 600 nm.

5.5.2 Complementación de la actividad

La cepa *fba*⁻ se transforma con el gen silvestre y se utiliza medio mínimo líquido con glicerol para la recuperación, las células recuperadas se evalúan por el crecimiento en presencia de glucosa (medio mínimo glucosa 2%) y en medio LB ambos medios suplementados con Amp-Km.

5.6 Caracterización del sistema de selección

5.6.1 Mutantes del gen de la aldolasa Clase II

5.6.1.1 Mutación dirigida

Tres mutantes de *fba* II reportadas en la literatura, las cuales presentan menor actividad que el gen silvestre por la modificación de los aminoácidos: arginina 331 por ácido glutámico, arginina 331 por Alanina (Qamar, 1996) y valina 301 por glicina (Singer, 1991), fueron obtenidos por mutación dirigida.

Los oligos empleados para los respectivos cambios son:

V301G: 5'TGGGAAGGCGGTCTGAACTACTAC3'

R331A / R331E: 5'TACGATCCGG(C/A)AGTATGGCGT3'

Se sigue el procedimiento descrito en Sambrook, 1989. Las mutantes se clonan en el vector pUC18 y la mutación puntual se verifica a través de secuencia.

5.6.1.2 PCR Mutagénica

La mutagénesis al azar del gen *fba* II se realiza

Agua dd	27 µl
Buffer 10X	10 µl
dNTPs	10 µl
MgCl ₂ 25 mM	25 µl
MnCl 5 mM	1 µl
BMOH	1 µl
Oligo IIA 20pmol/µl	7.5 µl
Oligo IIB 20pmol/µ	7.5 µl
DMSO 5%	10 µl
ADN 200ng/µl	2 µl

Taq polimerasa 4 μ l

- Ciclo a 95 °C por 3 min.
- 25 ciclos (95°C por 1 min., 50°C por 1 min. y 72°C por 1 min. 30 segundos.)
- Ciclo a 72°C 10 min.

El producto de PCR se digiere, se clona en el pUC 18 y se transforma en JM101. De ésta se platean 10 μ l en medio LB-Amp para cuantificar el tamaño del banco. Se seleccionan 10 colonias al azar para secuenciar y se determina la tasa mutagénica. El resto del banco se deja creciendo en 20 ml de medio LB-Amp a 37°C toda la noche. Los plámidos se purifican por el kit y posteriormente se transforman en la cepa *fba*⁻. Las células transformadas se recuperan en medio rico con glicerol Km-Amp 500 ng/ml de glucosa

5.6.2 Caracterización fenotípica

Las mutantes se analizan fenotípicamente después de ser transformadas en la cepa de selección en medio mínimo sólido con glicerol y medio mínimo sólido glicerol en presencia de diferentes concentraciones de glucosa (entre 0 y 1 mg/ml), 3 ml de medio se inocula con cada una de las células transformadas y se dejan en agitación por 12 horas a 37°C, se determina la densidad óptica en el espectrofotómetro a 600 nm. El cálculo de la concentración celular se realiza tomando como referencia 1 O.D(600nm) que equivale a 5X10⁸ UFC/ml (Unidades formadoras de colonia por mililitro), se realizan diluciones para sembrar por gota 5 μ l de 500,000; 50,000; 500 y 5 UFC/ μ l en cajas con medio mínimo glicerol y glucosa (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000) ng/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml y 1mg/ml

5.6.3 Cinéticas de Crecimiento de las mutantes

Las células (*fba*⁻) transformadas con los genes mutantes de *fba* II, se dejan crecer por 12 h. a 37°C en medio mínimo con glicerol, estos preinóculos se utilizan para inocular 3 ml de los medios: mínimo glicerol con 1 μ g/ml, 10 μ g/ml de glucosa y medio LB (suplementados con Amp-Km). La densidad óptica inicial a 600 nm debe ser la misma a tiempo cero para todas las muestras. Se realizan lecturas cada hora por un periodo de 12 horas. De cada variante se analizan tres colonias y con los datos obtenidos se realizan las curvas a partir de los promedios para comparar el crecimiento y también para calcular la velocidad específica de crecimiento de los cultivos. Como controles se emplea la cepa JM101, la cepa *fba*⁻ que en

los dos casos llevan el vector pUC18 y la cepa *fb^{a-}* complementada con el gen silvestre (pfb^{all}).

5.6.4 Determinación de la actividad de Aldolasa

La cepa *fb^{a-}* transformada con las mutantes del gen *fb^a* II se cultiva en medio mínimo líquido con glicerol Km-Amp por 12 horas a 37 °C. Se recupera la masa celular de 6 ml del cultivo los cuales se centrifugan a 10,000 rpm por 2 min., las células se resuspenden en 500 ml de agua. Se permeabilizan con 70 µl de SDS al 0.1% y 15 µl cloroformo y se mezcla (Singer *et al.*, 1991). Se toman 200 µl de muestra y se cuantifica la actividad por un kit diagnóstico para aldolasa (procedimiento No 752) de Sigma Chemical Co. La cuantificación se realiza por triplicado. Las reacciones colorimétricas se leen en el espectrofotómetro Beckman DU 650 a una longitud de 560 nm.

5.6.5 Análisis de proteínas

Se recupera la masa celular de cultivos de 2 ml de 12 horas de crecimiento de la cepa *fb^{a-}* con las variantes en medio mínimo con glicerol Km-Amp, por centrifugación a 10.000 rpm por 2 min. y se resuspenden en 500 µl de agua dd. Las muestras se mantienen en hielo y se sonicán tres veces por periodos de 20 segundos con intervalos de 20 segundos, 100 µl de cada muestra se trata con 100 µl de buffer de lisis, y se separan en un gel de SDS-PAGE siguiendo el protocolo descrito en Sambrook (1989).

5.7 Reconstrucción de la recuperación de variantes en el sistema de selección

A partir de cultivos en medio mínimo con glicerol y Amp-Km de una noche de crecimiento a 37°C, se realizan diluciones para sembrar simultáneamente 100 UFC de *fb^a* II con 1 millón de UFC de células *fb^{a-}* con pUC18, en medio mínimo sólido con 500 ng/ml de glucosa con su respectivo duplicado en medio mínimo sólido con glicerol Amp-Km. De la misma forma se probó la recuperación de la mutante R331E, R331A y V299G. Como control se sembró 1 millón de células de pUC18 en glicerol, 500 y en 700 ng/ml de glucosa.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de los genes *fba* clase I y II

Para obtener los genes de *fba* I y II se recurrió a la base de datos donde se encuentran reportadas las dos secuencias. Así se diseñaron los oligonucleótidos que sirvieron para amplificar por PCR los fragmentos que contienen los dos genes, para esto se tomó en cuenta los criterios sugeridos en Sambrook (1989). Estos fragmentos se insertaron en el vector pUC18 y posteriormente las construcciones se transformaron en células JM101 de *E. coli* con el fin de recuperar los plásmidos con las respectivas secuencias. Se verificó que las células seleccionadas tuvieran las construcciones correctas, por medio de PCR de colonia. Adicionalmente los plásmidos purificados de estas colonias, fueron tratados con las enzimas de restricción que liberan el fragmento, con el fin de validar la clonación. En la figura 7 se muestra la digestión para la construcción del inserto que contiene el gen *fba* II en el pUC18. La digestión para la construcción de *fba* I presenta el mismo patrón por esta razón no se muestra. Se obtuvieron 3 colonias positivas para cada gen.

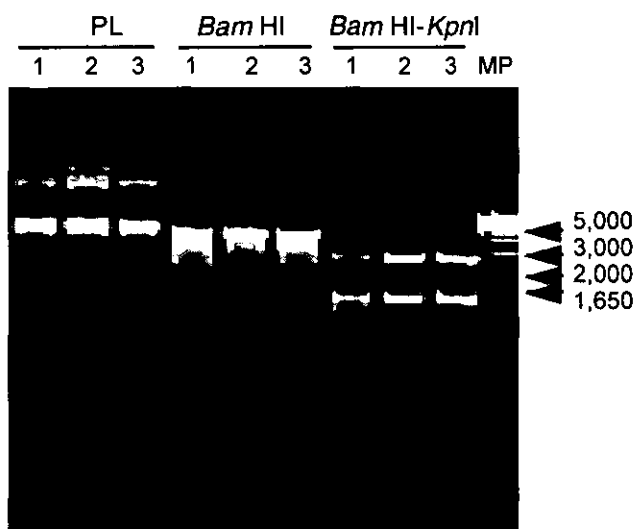


Figura 7. Digestión del plásmido pfbalI aislado de las colonias 1, 2, 3. PL plásmido, digestión con *Bam*HI y digestión con *Bam*HI y *Kpn*I, MP marcador de peso (pb).

Se verificó por secuencia que la amplificación por PCR no modificó los genes clonados en el pUC18, y en los dos casos los genes coinciden con los reportes en la literatura (Alefounder R. *et al.*, 1989 y Thomson G *et al.*, 1998). Los construcciones se denominaron pfbal y pfbalII correspondientes a los genes de aldolasa clase I y II.

6.2 “Knockout” o interrupción del gen *fba* en el cromosoma de *E. coli*

La metodología empleada fué la disrupción del gen en dos pasos (Hamilton *et al.*, 1989), para ésto se construyeron dos plásmidos y se realizó la doble recombinación, mediante los pasos descritos a continuación:

6.2.1 Construcción para la interrupción del gen *fba* II

6.2.1.1 Deleción e inserción de resistencia a Kanamicina

Se inactivó el gen *fba*, a través de digestión con la enzima *Bpu*AI que eliminó 54 pb en medio del gen de la aldolasa II del *pfb*II. La deleción se hizo con esta enzima porque se analizaron los sitios de restricción de la secuencia y se encontraron dos sitios únicos de corte de la enzima *Bpu*AI ubicados en medio del gen, lo cual facilitó el trabajo al emplear la misma enzima para inactivar la proteína. Posteriormente se introdujo el gen de resistencia a kanamicina en el mismo lugar de la deleción lo cual interrumpe el marco de lectura del gen *fba* II. Esta construcción fué transformada y recuperada en la cepa JM101 de *E. coli*. Se verificó la interrupción de dos maneras, primero porque la colonia creció en presencia del antibiótico kanamicina y segundo por PCR de colonia; la interrupción del gen modificó el tamaño del producto de PCR (1.500 pb. del gen *fba* II y 1.300 pb. del gen de resistencia a kanamicina), el fragmento amplificado fué de aproximadamente 2.800 pares de bases. Este nuevo plásmido fué denominado *pfb*ak (Fig. 5B).

6.2.1.2 Subclonación en *pMAK705*

La disrupción del gen en el cromosoma requiere del empleo de un vector que no pueda replicarse en las condiciones de selección del cointegrado, de modo que la construcción del gen *fba* II truncado con el gen de resistencia a kanamicina (*pfb*ak), se subclonó en el plásmido termosensible *pMAK705* (con resistencia a cloranfenicol) (Fig. 5B). Esta construcción se transformó en JM101 de *E. coli* y se recuperó por la selección en cloranfenicol. Se verificó por PCR de colonia la presencia del fragmento interrumpido (2800 pb) y por la digestión del plásmido purificado con las respectivas enzimas de restricción. Se obtuvieron dos fragmentos, uno de 5.500 pb correspondiente al vector y otro de 2.800 pb. que corresponde al inserto (gen interrumpido con Km) (Fig. 8). Este plásmido se llamó *pMfb*ak.



Figura 8. Digestiones de pMfbaK de los plásmidos de las colonias 1, 2 y 7 con las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I; MP Marcador de peso (23,130; 9,416; 6,557; 4,361; 2,322 y 2,0277 pb); P producto de PCR colonia 1; PD plásmido pMACK705 digerido con *Kpn*I y *Bam*HI.

6.2.2 Obtención de la cepa de *E. coli* mutante en el gen *fba* II

La inactivación del gen *fba* II en el cromosoma se realizó por medio de una doble recombinación entre el gen interrumpido en el plásmido pMfbaK y el gen *fba* II cromosomal de la cepa JM101 de *E. coli* siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos (sección 5.4.3) (Fig 1.B). El proceso consistió en la formación de un cointegrado por la homología entre la secuencia de *fba* II interrumpida y *fba* II cromosomal (primera recombinación), posteriormente se resolvió el cointegrado regenerándose el vector (segunda recombinación). En algunos casos se dió el intercambio del gen silvestre por la versión incompleta. Se recuperó una población celular resistente a Km en medio mínimo suplementado con glicerol a 42°C, la cual está formada por células modificadas por el intercambio del gen *fba* II silvestre con la construcción del gen *fba* II interrumpido con kanamicina y células no modificadas que retienen el plásmido en el cromosoma. Con la inactivación del gen *fba* II en el cromosoma la célula es incapaz de crecer en presencia de glucosa, por esto se utiliza sólo glicerol como fuente de carbono. Se seleccionaron 10 colonias de un total de 480, que presentaron el fenotipo esperado: crecimiento en presencia de kanamicina por la resistencia adquirida en el cromosoma, debido al intercambio de genes y ningún crecimiento en presencia de cloranfenicol por eliminación del vector.

Para verificar si éstas colonias realmente presentaban la mutación en el cromosoma, se hizo PCR empleando como templado el ADN cromosomal purificado y los oligonucleótidos que flanquean el gen de *fba* II. Se encontró que de las 10 solo 1 presentó la interrupción del gen (banda de 2.800) Fig. 9.

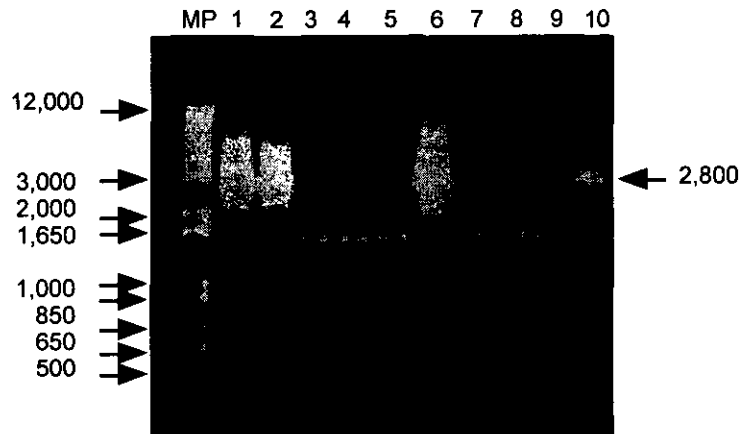


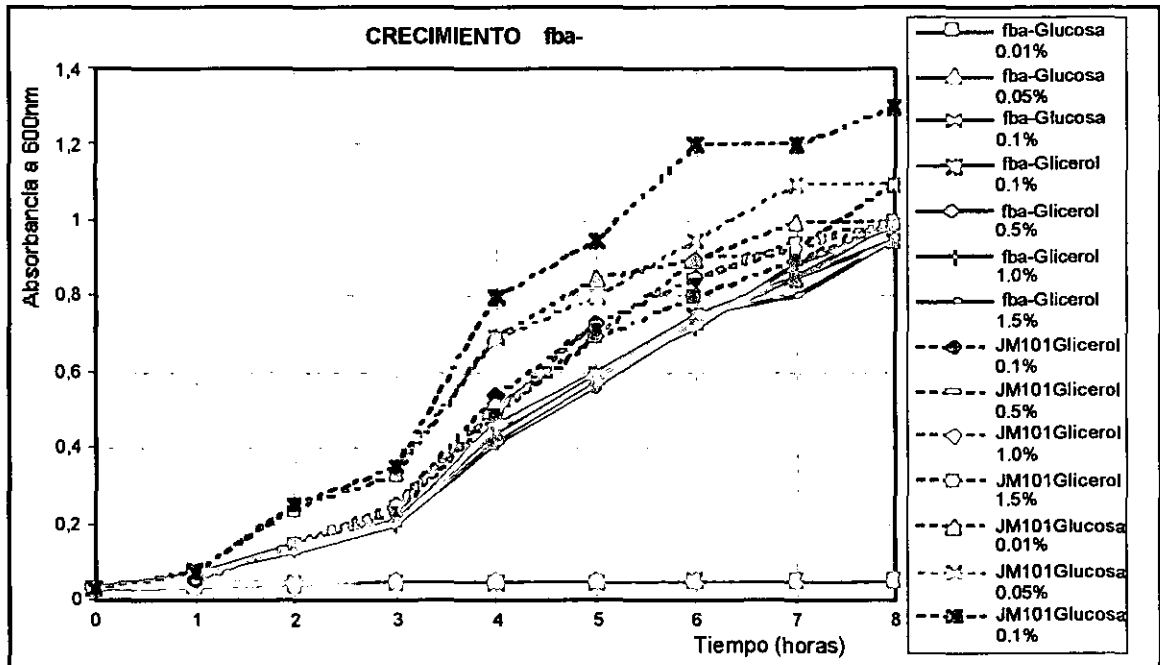
Figura 9. Comprobación de la interrupción de *fba* II a nivel cromosomal de 10 colonias. MP marcador de peso (pb).

La colonia seleccionada no logró crecer en presencia de glucosa, ni tampoco en medio LB. Adicionalmente, el producto de PCR obtenido del gen interrumpido de esta colonia se secuenció comprobándose la interrupción del gen en el cromosoma. La colonia seleccionada se denominó *fba*⁻.

6.3 Caracterización de la colonia seleccionada

6.3.1 Cinética de crecimiento

Con el fin de caracterizar la mutante *fba*⁻ y determinar modificaciones en el comportamiento de la mutante, se realizaron cinéticas de crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa y glicerol. Se observó que la mutante *fba*⁻ no creció a concentraciones entre 0.1 y 0.01% de glucosa, mientras que a concentraciones de glicerol entre 0.1 y 0.5 % el crecimiento fué similar al de la cepa silvestre JM101 (Gráfica 1).



Gráfica No 1. Cinética de crecimiento de la cepa *fba*⁻

6.3.2 Complementación de la actividad de aldolasa

Se realizó un experimento de complementación para validar la cepa construida. Esto básicamente consistió en la introducción del gen silvestre presente en el plásmido multicopia *pfball* en la cepa *fba*⁻. Las células adquirieron la resistencia del plásmido que porta el gen de β -lactamasa y crecieron en presencia de glucosa como única fuente de carbono. También se observó que la cepa *fba*⁻ complementada puede crecer en medio LB (Fig. 10).

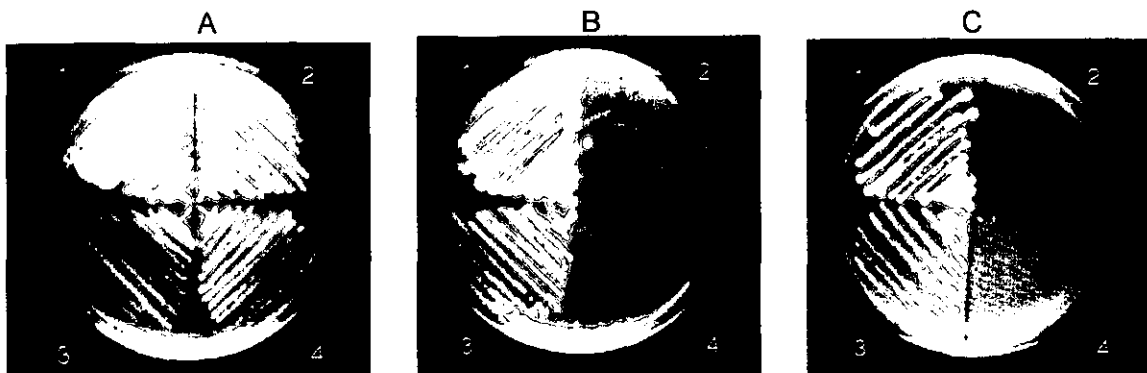


Figura 10. Complementación de la actividad de aldolasa: A. Crecimiento 0.5% glicerol B. Crecimiento 2mg/ml glucosa C. Crecimiento en medio LB. Los números corresponden a: 1. JM101; 2. *fba*⁻; 3. *fba*⁻*pfball*; 4. *pfba*⁻*pUC18*.

La cepa *fb^{a-}* también fué transformada con el plásmido *pfbaI*, las células lograron crecer, en glucosa y en medio LB.

6.4 Sensibilidad del sistema

6.4.1 Identificación de la concentración mínima de glucosa que inhibe el crecimiento de *fb^{a-}*

Para determinar la concentración mínima de glucosa que inhibe el crecimiento de la cepa de selección, ésta se creció en cajas que tenían diferentes concentraciones de glucosa. Se encontró que la mutante (*fb^{a-}*) puede crecer en concentraciones entre 0 y 500 ng/ml de glucosa, mientras que no se observó crecimiento a concentraciones superiores.

6.4.2 Mutantes del gen de la aldolasa Clase II

El sistema de selección debe permitir identificar actividades reducidas de aldolasa. Para ésto se probaron variantes creadas por mutagénesis dirigida (R331E, R331A y V299G) y por PCR mutagénica. El banco obtenido por PCR mutagénica fué de 5×10^4 variantes el cual tiene una tasa mutagénica del 0.12%. Los plásmidos que contenían mutaciones en *fb^{a I}* fueron retransformados en la cepa *fb^{a-}* y crecidos en medio LB y en concentraciones crecientes de glucosa. De este banco se aisló la mutante N324S, la cual presentó un menor tamaño de la colonia con respecto a la silvestre (JM101). Además de esta variante de menor actividad, se encontró otra variante con el codón de paro TAA en E159, esta variante fué denominada *fbami* (mutante inactiva) también se probó en los diferentes medios con glucosa y sólo pudo crecer en glicerol porque la proteína generada no tiene actividad de aldolasa.

Los plásmidos que llevan cada una de las variantes fueron probados en la cepa de selección (*fb^{a-}*) en medio sólido glicerol, encontrándose diferencias en el fenotipo con respecto a la cepa silvestre JM101 y con *fb^{a-}* con *pfbaII* (Fig. 11). La cepa *fb^{a-}* complementa con el gen silvestre (plásmido *pfbaII*) presentan un tamaño menor de colonia que el de la cepa JM101 con el pUC18, el comportamiento podría ser explicado por la modificación de la secuencia al introducir el gen de resistencia a kanamicina en el cromosoma, lo cual se ve reflejado en un menor tamaño de las colonias. Las mutantes de *fb^{a II}* presentan tamaños menores que la complementada con el

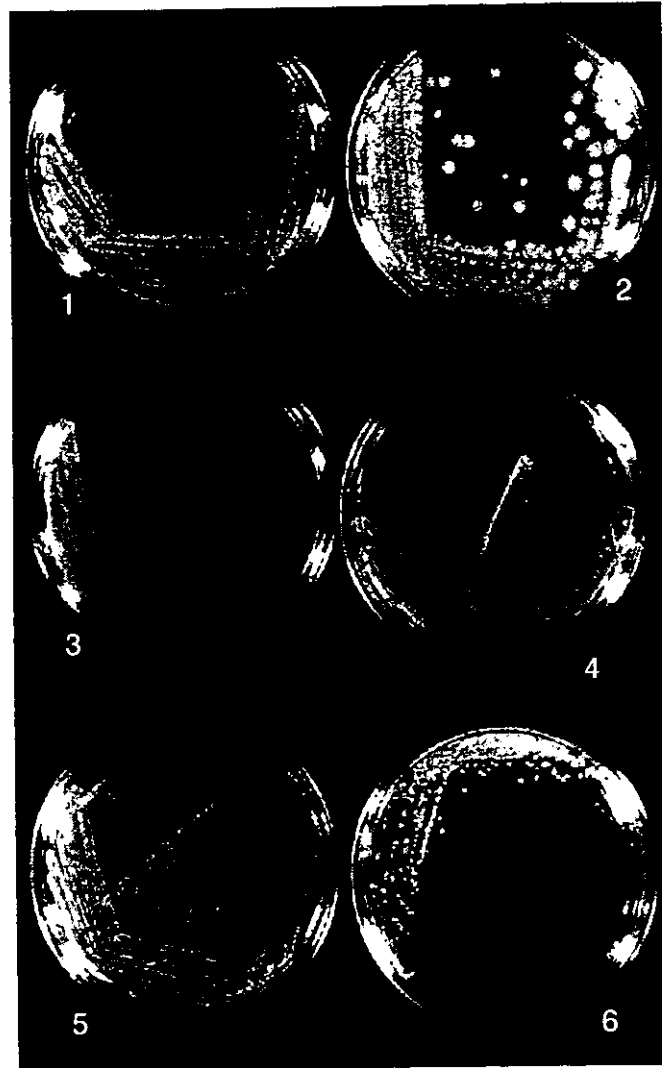


Figura 11. Fenotipo de las variantes en *fba*: 1. V229G; 2. Control JM101 pUC18; 3. N324S; 4. R331E; 5. R331A; 6. pfball

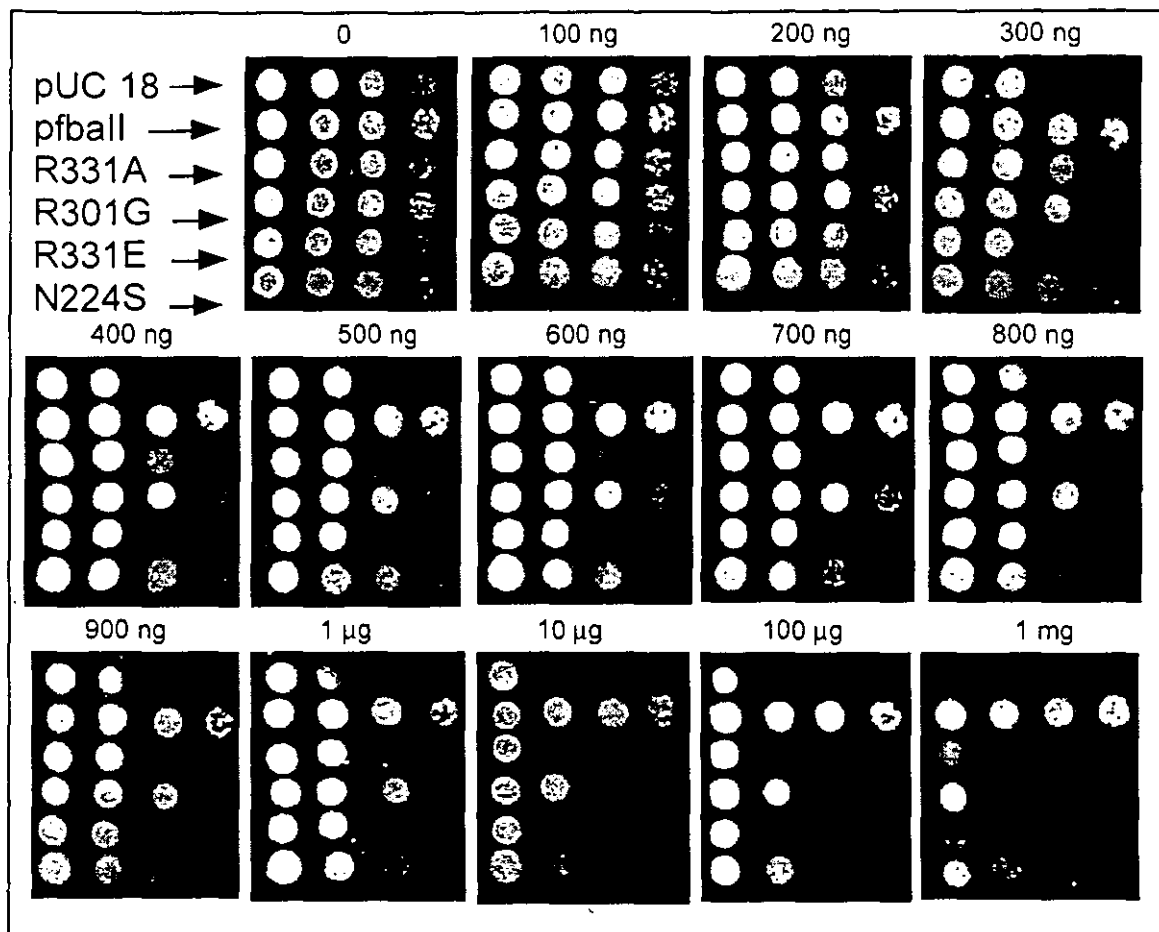


Figura 12. Crecimiento de las variantes de *fba II* en la cepa *fba⁻* en diferentes concentraciones de glucosa, empleando 4 concentraciones celulares (de izquierda a derecha) 5×10^5 ; 5×10^4 , 500 y 5 UFC/ μ l.

Tabla 1. Crecimiento de las mutantes en glucosa.

	0	100 ng	200 ng	300 ng	400 ng	500 ng	600 ng	700 ng	800 ng	900 ng	1 μg	10 μg	100 μg	1 mg
5 X 10⁶ UFC/μl														
pUC18	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
pfbalI	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
V299G	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
R331A	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
R331E	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
N324S	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
5 X 10⁴ UFC/μl														
pUC18	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—
pfbalI	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
V299G	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
R331A	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—
R331E	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—
N324S	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+
500 UFC/μl														
pUC18	++++	++++	++++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pfbalI	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
V299G	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—
R331A	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	+	+	+	—	—	—	—
R331E	++++	++++	++++	++	++	+	+	+	—	—	—	—	—	—
N324S	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	+
5 UFC/μl														
pUC18	++++	++++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
pfbalI	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
V299G	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—
R331A	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—	—	—	—	—
R331E	++++	++++	++	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N324S	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—

— Ningún crecimiento

++++ Crecimiento similar al de la *fb*a complementada con pfbalI en glicerol

+++ y ++ Crecimiento de menor tamaño que el de la *fb*a complementada con pfbalI en glicerol

+ Crecimiento de colonias diminutas

gen silvestre, debido a la reducción de la actividad. Las que retienen mayor actividad son un poco más grandes que las que son menos activas, ésta correlación entre el nivel de actividad y el tamaño de la colonia indica que es posible diferenciar las enzimas más activas de las de menor actividad por el tamaño de la colonia. De la misma forma las variantes se sembraron en presencia de diferentes concentraciones de glucosa, empleando 4 concentraciones celulares (Fig. 12), ésto para ver el efecto de la densidad celular en la sobrevivencia y crecimiento celular en diferentes concentraciones de glucosa. Los resultados se presentan en la tabla 1. Las mutantes de *fba* II no pueden crecer en las mismas concentraciones de glucosa que la silvestre, ya que mientras ésta puede crecer hasta 1mg/ml, las mutantes pueden hacerlo en concentraciones mucho menores, del orden de ng/ml.

6.4.3 Expresión de la proteína

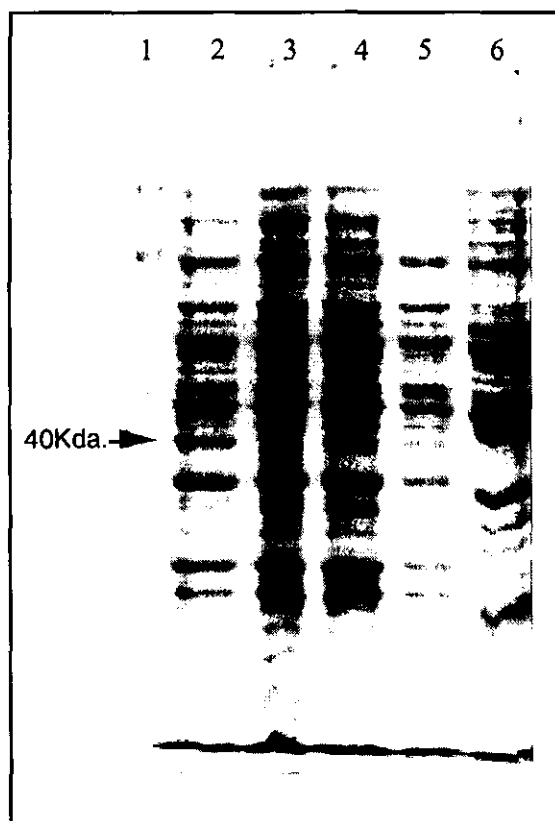


Figura 13. Análisis cualitativo de proteína de los extractos celulares. Gel desnaturante de poliacrilamida 9% SDS. Carril 1 Marcador de peso 200, 97, 66, 42, 23 y 14 Kda; carril 2 *fba*⁻pfball, carril 3 *fba*⁻; carril 4 JM101 pUC18; carril 5 R331E; carril 6 *fba*⁻fbami.

Para probar que realmente las proteínas silvestre y mutantes se expresaban *in vivo*, se analizaron los extractos celulares de algunas variantes clonadas en el sistema de

selección: R331E y *fbami* frente al gen silvestre *pfball*, el *pUC18* y *pUC18* en JM101. La figura 13 muestra el gel SDS-PAGE. Teniendo en cuenta que la proteína Fba clase II de *E. coli* es de 40 KDa, se observan las siguientes diferencias: hay una mayor concentración de proteína Fba II en la cepa complementada con *pfball* que en JM101, así mismo se ve la expresión de la proteína mutante en R331E. No se observa la banda de proteína en los extractos de la cepa de selección *fbai* que tiene deletado el gen en el cromosoma, ni en la *fbami* que es la variante del gen *fba* II truncado.

6.4.4 Cuantificación de la actividad de aldolasa

Las actividades de las mutantes se cuantificaron usando un kit para detectar la actividad de aldolasa. En esta determinación se obtuvieron datos variables con las mutantes de más baja actividad. Los datos aquí presentados fueron obtenidos en una serie única, cada muestra fué analizada por triplicado. El valor de actividad determinado para la mutante V299G concuerda con el reporte en la literatura, pero las actividades de las mutantes más deficientes son muy altas con respecto a las constantes cinéticas reportadas.

Actividad de aldolasa calculado sobre la actividad del gen silvestre de JM 101

<i>fbai</i> puc 18	1.33% (en relacion a <i>fba</i> I)
N324S	5.60%
R331A	9.73%
V299G	8.50%
R331E	2.66%
<i>pfball</i>	116.00%
JM 101	100.00%

5.4.5 Cinéticas de crecimiento

Dada la variabilidad del método anterior se realizaron las cinéticas de crecimiento de las mutantes en medio mínimo líquido con glucosa y LB. Para cuantificar las diferencias de actividad que se ven reflejadas en la velocidad de crecimiento, se realizaron cinéticas sobre tres colonias de cada variante. Las diferencias se pueden observar en las gráficas 2, 3 y 4. El crecimiento de las mutantes es parecido en la concentración 1µg/ml de glucosa, mientras que en medio mínimo con 10µg/ml de glucosa y LB se ven diferencias en la velocidad de crecimiento. La cepa silvestre JM101 en todos los casos, mostró crecimiento más acelerado, incluso que en la cepa *fbai* complementada con *pfball*.

R331A y R331E. Las colonias obtenidas en el medio selectivo se analizaron por PCR de colonia. La muestra fué de 5 colonias por cada variante y el resultado dió:

	Con inserto (variante del gen <i>fba</i> II)	Falsas positivas
pfball	5	0
V299G	5	0
R331A	4	1
R331E	3	2

En este ensayo se vió la aparición de colonias que fueron falsos positivos, estas son células que presentan alguna ventaja adaptativa y logran sobrevivir en presencia de glucosa. Los controles del ruido de fondo (1×10^6 de *fba* pUC18) en el medio selectivo (500 y 700 ng/ml de glucosa) mostraron que no siempre aparecen falsas positivas, en algunos casos aparecieron células contables (1, 5, o 9) a las 36 horas de crecimiento. El ruido de fondo apareció como colonias medianas con respecto a las recuperadas con actividad de la silvestre, mientras que las colonias que portaban las mutantes de R331 fueron colonias pequeñas, lo cual concuerda con el fenotipo observado de estas mutantes.

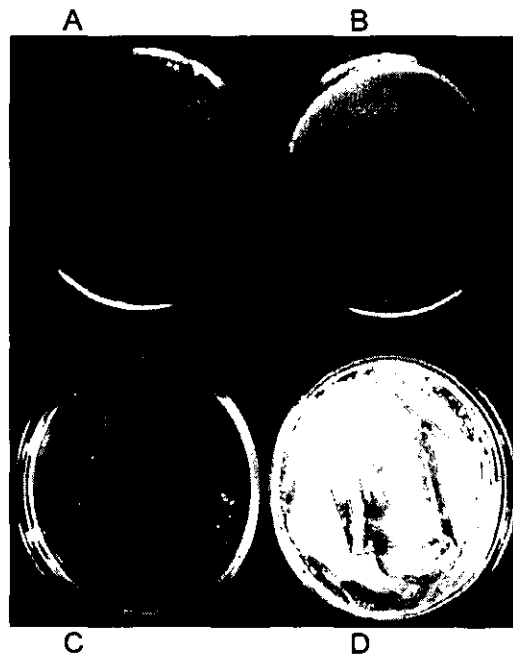


Figura 14. Recuperación de variantes de *fba* II con actividad en 1 millón de células. A y C medio mínimo con glucosa Km-Amp. B y D medio mínimo glicerol Km-Amp: A y B Recuperación de pfball, C y D Recuperación de R331E

7. DISCUSION

7.1 Genes *fba* I y II

La amplificación de los genes del cromosoma se hizo con 200 pb. adicionales al extremo de cada gen, éstas son las distancias promedio que separan a cada uno de los genes vecinos y se evitó amplificar parte de la secuencia de otros genes. Esto es muy importante, ya que se podrían introducir modificaciones en los genes aledaños (Fig. 4) en el proceso de inactivación del gen *fba* por la doble recombinación; ésto como resultado de posibles modificaciones en la amplificación de los segmentos que contienen los genes. Si ésto ocurre se podría generar una cepa con varios genes alterados, y el fenotipo observado no sería por la mutación del gen *fba* II, lo cual no es favorable para el objetivo planteado de lograr detectar variantes con actividad de aldolasa.

La clonación de los genes fué exitosa ya que las secuencias no fueron modificadas y las regiones promotoras silvestres, permitieron la expresión independiente del promotor del vector. De tal forma que no fué necesario realizar construcciones adicionales para lograr la expresión de la proteína y los mismos plásmidos fueron utilizados para las pruebas de complementación de la actividad.

7.2 Generación de la cepa de selección. "Knockout" de *fba* II en *E. coli*

En el primer paso se eliminaron 54 pares de bases, que corresponden a la región que codifica desde el residuo 186 al 204 (la proteína está formada por 359 aa). A nivel estructural la deleción se ubica desde la mitad del asa entre $\beta 5$ y $\alpha 7$ hasta el residuo 5 de $\alpha 7$, por lo cual existe una probabilidad muy alta de que se pierda la actividad enzimática. Esta modificación de la estructura terciaria puede afectar la unión al cofactor (Zn^{2+}), así como alterar el espacio requerido para la catálisis, y como consecuencia la pérdida de la actividad enzimática. Para asegurar la inactivación de la enzima y facilitar la identificación de la mutante, se introdujo el gen de resistencia a Km con su promotor silvestre en el mismo sitio donde se realizó la deleción. Si la secuencia fuese traducida, correspondería a medio barril carente de actividad, debido a la que la fracción deletada es indispensable para la formación del dímero y para proporcionar el sitio de la catálisis.

El protocolo empleado para eliminar de manera específica el gen *fba* II (Hamilton *et al.*, 1989), fué modificado para seleccionar la doble recombinante: se utilizó medio mínimo

suplementado con glicerol como única fuente de carbono, para permitir el crecimiento de las células en las que el reemplazo fué exitoso, ya que la glucosa del medio es tóxica para la mutante. La mayoría de las colonias obtenidas tenían el gen intacto, por lo que fué necesario muestrear un total de 500 colonias en busca del fenotipo esperado: crecimiento en presencia de kanamicina por la resistencia adquirida en el cromosoma, debido al intercambio de genes y ningún crecimiento en presencia de cloranfenicol por eliminación del vector. La baja proporción de células interrumpidas es por la baja frecuencia de inserción ya que las regiones homólogas para recombinar son pequeñas (700 pb. a cada lado) y se ha reportado en la literatura que entre menor es la zona, menor es el porcentaje de recombinación (Hamilton *et al.* 1989). Aunque se encontraron 10 colonias con este fenotipo, por análisis de PCR se determinó que sólo en una ocurrió el intercambio esperado dando una banda de 2,800 pb (cepa *fba*⁻) (Fig. 9), unas presentaban las dos bandas que corresponden al gen *fba* II silvestre y al truncado posiblemente por una recombinación inespecífica en el cromosoma. Otras sólo presentaron el gen *fba* II silvestre, pero por algún mecanismo retuvieron la resistencia a kanamicina.

Al parecer la mutación obtenida del gene *fba* II a nivel cromosomal no constituye una mutación polar, ya que está ubicado al final del grupo de genes (Fig. 4), de manera que la interrupción no afecta la expresión de los genes aledaños y el comportamiento observado en las células puede ser el efecto de la pérdida de la actividad de Fba II.

Como se esperaba, la carencia de la enzima en la vía glicolítica impidió el crecimiento en presencia de glucosa, mientras que el crecimiento fué similar a la cepa silvestre JM101 en presencia de glicerol. Este comportamiento fué reportado en los primeros artículos de mutantes de *E. coli*, que sólo lograron crecer en presencia de glicerol o succinato (Irani and Maitra, 1977), y piruvato o lactato (Striblim and Perham, 1973) como consecuencia de la inactivación de la proteína Fba II. Este resultado sugiere que el sistema de selección podría estar basado únicamente en la delección de la aldolasa clase II. No se esperaba la inhibición del crecimiento de la cepa *fba*⁻ en medio LB, esto puede ser porque contiene el extracto de levadura, el cual debe poseer una cantidad de carbohidratos suficiente para intoxicar a las células *fba*⁻. Por esta razón la recuperación de las células *fba*⁻ electrotransformadas no se hizo sobre medio SOC; éste se reemplazó por medio mínimo glicerol y no se afectó el proceso de recuperación.

El empleo del medio combinado glicerol con glucosa tampoco permitió el crecimiento de la mutante, lo cual puede ser explicado por la regulación en *E. coli* y por el consumo

preferencial de glucosa. El carbohidrato es enviado a la vía glicolítica, pero no puede ser transformado por la *fba* II inactivada y hay acumulación de azúcares fosforilados, especialmente fructosa-1,6-bisfosfato (Davis *et al.*, 1984). La aldolasa clase I no puede suplir la actividad porque en presencia de glucosa, ésta no se expresa (Stribling and Perham, 1973). El anterior resultado reafirma que el *knockout* de *fba* II puede ser suficiente para generar el sistema de selección.

Es importante considerar que las células pueden modificar los mecanismos regulatorios para sobrevivir ante presiones selectivas, como la de la *fba*⁻ en presencia de glucosa, lo que podría hacer que la célula active a *fba* I. Fastrez (1997) menciona que una actividad hallada en el medio selectivo, puede ser el resultado de mutaciones, no sólo del gen que codifica la enzima blanco que ha sido mutagenizada sino por mutaciones de otros genes. Una mutación en un gen regulatorio es el primer evento observado en condiciones experimentales, luego el gen estructural es desreprimido y aparece la expresión constitutiva. Por lo tanto la cepa de selección debe ser probada para determinar si este tipo de mecanismos se presentan con una alta frecuencia, lo cual también sería inapropiado para su empleo en selección ya que daría falsos positivos. Esto se realizó al simular la recuperación de la mutante más inactiva que será discutido más adelante.

Las cinéticas de crecimiento de las cepas *fba*⁻ y JM101 mostraron el efecto de la inactivación del gen *fba* II. *E. coli* crece más rápido en glucosa (al incrementar la concentración de glucosa, se incrementa la velocidad de crecimiento) que en cualquier otra fuente de carbono. En contraste la cepa *fba*⁻ no pudo crecer en las concentraciones de glucosa empleadas, mientras que el glicerol le permitió sobrevivir y no se ven diferencias en las velocidades de crecimiento, aunque el glicerol se utilice en concentraciones menores a las recomendadas para los medios de cultivo, este comportamiento fué reportado por Böck y Neidhardt (1966).

La cepa de selección permitió la complementación homóloga. *fba*⁻ transformada con *pfball*, fué capaz de crecer en presencia de glucosa, demostrando que el gen clonado es funcional. Las células complementadas también crecieron en presencia de glicerol y en medio LB (Fig. 10).

7.3 Sensibilidad del sistema de selección

Aunque se determinó que la cepa de selección no crece en medio líquido en la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (0.01%) de glucosa, fué necesario determinar la concentración mínima de glucosa que inhibe el crecimiento de *fba*⁻. Se encontró que utilizando 500 UFC por caja (para obtener células aisladas) las células pueden crecer en medio sólido a concentraciones entre 0 y 300 ng/ml de glucosa. Este resultado permitió establecer condiciones preliminares en las cuales podría ser empleado el sistema de selección, ya que las células que presenten actividad de aldolasa, podrán ser recuperadas a mayores concentraciones de glucosa, eliminado el ruido de fondo de aquellas células carentes de esta actividad.

Una de las características deseables de los sistemas de selección, es que permitan detectar diversos niveles de una determinada actividad. En el caso particular de evolución dirigida e ingeniería de proteínas, se persigue detectar desde actividades vestigiales hasta actividades superiores a la silvestre. Las variantes generadas de *fba* II permitieron establecer el rango dinámico del sistema de selección.

El comportamiento mostrado por las mutantes de *fba* II se puede explicar por medio del alineamiento de las secuencias de aldolasas de varios organismos. Las mutantes de menor actividad fueron generadas por la modificación de la arginina 331, se puede ver en la figura 15 que éste es un residuo conservado en todas las secuencias analizadas. Al parecer está involucrado en la formación del dímero y en el reconocimiento del sustrato fructosa-1,6-bisfosfato (Qamar *et al.*, 1996). El cambio de esta arginina que es un residuo básico por alanina un residuo más pequeño y de tipo alifático, causa una reducción de la eficiencia catalítica de 770 veces. El cambio más drástico se dió al reemplazar la arginina por ácido glutámico de carácter ácido, el cual reduce la eficiencia catalítica 7.000 veces, esto puede ser causado por la repulsión electrostática entre el grupo ácido del residuo y el fosfato del sustrato fructosa-1,6-bisfosfato (Qamar *et al.*, 1996).

La otra mutante creada por mutagénesis dirigida fué el cambio en la valina 299 por glicina, en el alineamiento se ve que los aminoácidos en esta posición son preferencialmente valina, isoleucina y leucina (V, I y L) los cuales son aminoácido alifáticos de tres o cuatro carbonos; el cambio a un residuo más pequeño como glicina, redujo la actividad a un 8 % de la silvestre, debido a que la proteína generada es termosensible (Singer *et al.*, 1991).

	300	310	320	330
alf_ecoli				
alf_haein	GVLNYYKANEAYLQGQLGNPKGEDQPNNKKYYDPRVWLR			
alf_camje	GILNFKANEAYLQGQLGNPEGPDAPNNKKYYDPRVWLR			
alf_neucr	GVREYELKNRAYLQGQIGNPEGDDKPNKKYYDPRVWLR			
alf_schpo	GIRDYILNNDYLRSSQVGNPEGPNKPNKKYYDPRVWIR			
alf_yeast	GVRDYVLKYKDYLMTPVGNPEGADKPNKKKFDPRVWIR			
alf_corgl	GIRDYVLNKKDYIMSPVGNPEGPEKPNKKKFFDPRVWVR			
alf_mycge	PIVSHMFENYNGVLKIDGVEG-----NKKAYDPRSYMK			
alf_mycpn	EIRKYIESN-----KDLDLNKKGYDPRKLLK			
alf2_bacsu	AIREYV-----EAKKDLDTNKGYPDKLLK			
alf1_bacsu	ETRRMF-----QENSPLYEPRGYLT			
alf_strpn	AV-----RETLAAKPDEYDPRKYLK			
alf_bacst	ATRKFFARDYEA-----NEAEYDKKKLFDPRKFLA			
gaty_ecoli	AVRELL-----AKDPNVYDPRKIIG			
agay_ecoli	AVRELL-----AKDPNVYDPRKIIG			
alf_xanfl	ALKNYL-----TEHPEATDPRDYLO			
alf2_rhoca	AVKAWF-----AENPQGNDRYYMR			
	AIRRV-----GAKNKSEFDPRKFMA			

Figura 15. Alineamiento de aldolasas. alf_ecoli *Escherichia coli*, alf_haein *Haemophilus influenzae*, alf_camje *Campylobacter jejuni*, alf_neucr *Neurospora crassa*, alf_schpo *Bacillus subtilis*, alf_yeast *Saccharomyces cerevisiae*, alf_corgl *Corynebacterium glutamicum*, alf_mycge *Mycoplasma genitalium*, alf_mycpn *Mycoplasma pneumoniae*, alf2_bacsu *Bacillus subtilis* clase 2, alf1_bacsu *Bacillus subtilis* clase1, alf_strpn *Streptomyces pneumoniae*, alf_bacst *Bacillus stearothermophilus*, gaty_ecoli tagatose-bisphosphate aldolase gaty, agay_ecoli tagatose-bisphosphate aldolase agay, alf_xanfl *Xanthobacter flavus*, alf2_rhoca *Rhodobacter*.

De las mutantes obtenidas por PCR mutagénica que fueron secuenciadas, se encontraron secuencias que corresponden al gen silvestre y secuencias con cambios silenciosos o cambios en los residuos que no son conservados. El crecimiento de estas mutantes en las diferentes concentraciones de glucosa fué similar al silvestre, lo cual indica que la mayoría de los cambios logrados en las variantes recuperadas no modifican de forma considerable la actividad de la enzima, ya que el crecimiento de éstas fué igual al de la cepa complementada con el gen silvestre. Sólo la mutante N324S presentó menor actividad que el gen silvestre. Al observar el alineamiento se ve que la asparagina 324 en *E. coli* está cambiada por histidina y aspártico (H y D) en otros organismos. Con base en la estructura de la proteína se pudo determinar que este residuo se ubica en el asa entre las hélices $\alpha 10$ y $\alpha 11$, por el cual se forma el dímero, es probable que la presencia de este tipo de residuos orienten la localización del asa. El cambio de asparagina a serina podría causar una modificación en la estructura del asa, ya que la serina ocupa un menor volumen, lo cual podría dificultar la dimerización de la enzima disminuyendo la actividad.

Las mutantes generadas presentan diferentes niveles de actividad y se vió reflejado en el crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa en medio sólido (ver resultados

Fig.12 y Tabla 1). Se establecieron las concentraciones de glucosa que pueden soportar las mutantes con respecto a cuatro concentraciones celulares. Si se tiene en cuenta los fenotipos observados al crecer las variantes en glicerol, las actividades reportadas en la literatura y la implicación de los residuos modificados para actividad, no es difícil ver que las mutantes de menor actividad (cambio en arginina 331), son las que más se parecen a la cepa de selección que sólo porta el plásmido (*fba*⁻pUC18). En el cultivo directo (5×10^5 UFC/ μ l) y en la concentración celular de 5×10^4 UFC/ μ l no se alcanzan a ver diferencias de actividad ya que la cepa con pUC18, R331A y R331E crecen hasta 100 μ g/ml en la primera, y hasta 1 μ g/ml en la segunda concentración celular. Las diferencias se observaron en las menores concentraciones celulares, donde se recuperaron colonias aisladas y fué posible diferenciarlas (Tabla 3.): en 500 UFC/ μ l, *fba*⁻ pUC18 crece hasta 200 ng/ml de glucosa y las mutantes crecen hasta 900 (R331A) y 600 (R331E) ng/ml de glucosa, en 5 UFC/ μ l el pUC18 crece hasta 100 ng/ml de glucosa, y la mutantes en 600 (R331A) y 200 (R331E) ng/ml, es decir que estas variantes están delimitando la capacidad de identificar un nivel de actividad de aldolasa muy bajo.

TABLA 3. CRECIMIENTO DE LAS MUTANTES EN GLUCOSA

Variante	5×10^5 UFC/ μ l	5×10^4 UFC/ μ l	500 UFC/ μ l	5 UFC/ μ l
<i>fba</i> ⁻ puc 18	100 μ g/ml	1 μ g/ml	200 ng/ml	100 ng/ml
<i>fba</i> ⁻ pfball	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml
V299G	1 mg/ml	100 g/ml	1 μ g/ml	1 μ g/ml
R331A	100 μ g/ml	1 μ g/ml	900 ng/ml	600 ng/ml
R331E	100 μ g/ml	1 μ g/ml	600 ng/ml	200 n/ml
N324S	1 mg/ml	100 g/ml	1 μ g/ml	1 μ g/ml

Con respecto a las mutantes V299G y N324S que son más activas que las mutantes del residuo 331, las diferencias son notables ya que cada concentración celular presentó crecimiento a concentraciones de glucosa superiores en uno o dos órdenes de magnitud con respecto al pUC18. Estos datos permitieron establecer las condiciones para seleccionar. Es posible recuperar actividades de aldolasa muy bajas empleando el medio sólido a concentraciones de 500 ng/ml de glucosa y concentraciones celulares bajas, para evitar el efecto cooperativo. Este efecto se observa con frecuencia en los sistemas de selección, como en la selección para la actividad de β -lactamasa donde las bibliotecas fueron transformadas y plateadas en una alta densidad celular. Se encontraron colonias

que expresaban β -lactamasa inactiva, esto se debió a que las colonias que producen enzimas activas ayudan a las vecinas a destruir el antibiótico en el medio de cultivo (Fastrez, 1989). Esto también podría suceder en el sistema de selección para la actividad de aldolasa, ya que una alta densidad celular podría tomar la glucosa presente en el medio intoxicándose la mayoría y algunas células tendrían posibilidad de sobrevivir utilizando el glicerol o los casaaminoácidos como fuente de carbono. Por esta razón se debe seleccionar empleando concentraciones celulares de aproximadamente 1×10^6 UFC reduciendo este tipo de problemas.

Por medio de las cinéticas de crecimiento se logró establecer las diferencias de actividad entre las mutantes calculando la velocidad específica de crecimiento en los medios líquido con glucosa (1 y 10 $\mu\text{g/ml}$) y líquido LB. Las curvas del crecimiento de la cepa complementada (*fba*⁻ con pfbal) muestra una velocidad de crecimiento menor que la JM101 con el pUC18 en presencia de glucosa y en LB, como ya se vió en medio sólido con glicerol (debido a las razones anteriormente analizadas de la presión metabólica a la que está sometida la célula), mientras que la cepa silvestre tiene la ruta glicolítica completamente funcional.

En las cinéticas de crecimiento en 1 $\mu\text{g/ml}$ de glucosa, se vió que las células transformadas con las mutantes pueden crecer y no hay variaciones considerables con respecto a la cepa complementada con el gen silvestre y a *fba*⁻ con el pUC18; ésto se ve reflejado en las velocidades específicas de crecimiento (Tabla 2). La *fba*⁻ también puede crecer en esta concentración, lo cual puede ser explicado porque la concentración de glucosa es muy baja. Las células que alcancen a sobrevivir pueden emplear el glicerol presente en el medio para duplicarse. Lo anterior es confirmado porque el incremento de la concentración de glucosa a 10 $\mu\text{g/ml}$ e incluso el medio LB, produce la inhibición del crecimiento de *fba*⁻ y la disminución de la velocidad específica de crecimiento.

Las células transformadas con las mutantes de *fba* II en el residuo 331 que disminuyen drásticamente la actividad, crecen ligeramente mejor con respecto a la *fba*⁻. El comportamiento de la mutante R331E de más baja actividad, es muy parecido al de la cepa de selección (*fba*⁻) en los tres medios empleados (Gráficas 2, 3 y 4.), las diferencias se ven a las 24 horas de crecimiento donde la densidad celular de la mutante se incrementó mientras que la cepa de selección permanece prácticamente constante, sin embargo, las diferencias entre las dos pueden ser detectadas en medio sólido como se observó en el crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa (Fig. 12), ya que la actividad de la

mutante permite el crecimiento en concentraciones bajas de glucosa, pero en este caso limita la velocidad de transformación de la glucosa y se ve reflejado en la velocidad de crecimiento.

Por otra parte las mutantes que retienen un mayor nivel actividad de aldolasa, presentan velocidades específicas de crecimiento superiores a las de *fb^{a-}* con pUC18 en 10µg/ml de glucosa y en LB. Es decir que el crecimiento se relaciona con el tipo de cambio producido en la enzima, es decir que la sobrevivencia y crecimiento celular observado puede ser el resultado del nivel de actividad que las mutantes de aldolasa pueden retener.

Al cuantificar la actividad enzimática de las mutantes con el kit de aldolasa, se presentaron dificultades en la determinación ya que los resultados no fueron reproducibles para determinar actividades bajas. Por el contrario, las actividades de la cepa silvestre (JM101) y la complementada *fb^{a-}* pfball, siempre fueron fácilmente detectables, siendo la complementada con pfball superior a la JM101, como ya se había observado en la expresión de proteínas, debido al mayor número de copias el gen. Las razones de la variabilidad puede ser porque el kit esta diseñado para diagnóstico en muestras de sangre, y no presenta tanta sensibilidad para cuantificar actividades tan bajas como las de las mutantes. Es claro que los resultados obtenidos no tienen correlación con las constantes cinéticas reportadas para las mutantes de menor actividad (modificación en R331 Qamar et al., 1996).

	Kcat (mM)	Km (min ⁻¹)
Silvestre	0.19±0.03	490.0±26
R331A	5.1±0.7	17.1±1.4
R331E	10.0±2.8	3.7±0.4

Es muy probable que estas actividades tan bajas requieran de métodos más sensibles. Por eso es recomendable que la actividad enzimática de las proteínas que sean recuperadas, se purifiquen previamente para determinar las constantes catalíticas de las enzimas identificadas.

7.4. Reconstrucción de la recuperación de variantes en el sistema de selección

Se ha visto que no siempre los sistemas de selección pueden identificar actividades enzimáticas que aparentemente deberían permitir la sobrevivencia de las células (Fastrez, 1989), como ocurrió en la selección de anticuerpos catalíticos. En la primera etapa se

encontró un anticuerpo con actividad catalítica para convertir corismato a pafenato, un paso crucial en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos; este anticuerpo complementó la auxotrofia en una cepa de *E. coli*. El gen que codificaba para el anticuerpo luego fué expresado en el citoplasma de una levadura carente de la actividad de la enzima corismato mutasa. La actividad del anticuerpo es 5,000 veces menor que la actividad silvestre y fué incapaz de rescatar a la célula hospedera en el medio de selección (Tang *et al.*, 1991). La aparición de colonias carentes de actividad en los medios selectivos es otro problema de los sistemas de selección como se describió al anteriormente. Por estas razones la cepa *fba⁻* fué probada para observar estos dos problemas comunes en la selección directa.

El sistema de selección puede ser utilizado cuando se busquen variantes de muy baja actividad, las cuales serán generadas en las primeras etapas de una migración catalítica o en los pasos de incremento de actividad enzimática. Como hemos visto lo ideal es que aquellas variantes que no complementen la actividad, no sean falsos positivos en el medio de selección, ya sea por las adaptaciones de la célula o por el efecto cooperativo. El sistema de selección desarrollado presenta este problema en una baja proporción, pero permitió que las mutantes como V299G (tiene 8 % de actividad de la silvestre) se recuperan a las 24 horas, y que las menos activas se recuperaran las 48 horas, éstas son colonias pequeñas, fenotipo que puede ayudar a diferenciarlas del ruido de fondo.

La presencia de falsas positivas podrán ser evaluadas por el crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa a varias concentraciones celulares frente al control negativo (*fba⁻* con el vector) y al control positivo (*fba⁻* con R331), ya que es una manera efectiva de descartar las variantes sin actividad. Una vez recuperadas las variantes activas, éstas deberán ser retransformadas para confirmar la actividad.

En sistema de selección puede ser utilizado de las siguientes formas:

Trabajando a baja densidad celular, plateado alrededor de 5×10^4 células por caja en 300 ng/ml glucosa. Trabajando a alta densidad celular: plateando hasta 1×10^6 de células por caja en 500 ng/ml glucosa, será posible recuperar células con una eficiencia catalítica 7,000 veces menos activas que la silvestre, las cuales se observarán entre las 36 y 48 horas como colonias pequeñas. Si se buscan mutantes más activas fácilmente se podrán diferenciar por el tamaño de la colonia y/o por el crecimiento celular en concentraciones mayores de glucosa a las 24 horas de crecimiento.

Otra alternativa para rescatar las mutantes de muy baja actividad de aldolasa es el empleo de sistemas de expresión inducibles o con promotores fuertes tipo TRC (Makrides, 1996), los cuales incrementan el nivel de expresión de la proteína y podrían conferirle a la célula una ventaja para sobrevivir en glucosa, incluso en una concentración mayor de glucosa y es probable que esto disminuya el ruido de fondo de aquellas variantes totalmente inactivas.

8. CONCLUSIONES

_ Se logró la clonación de los genes de fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa clase I y II de *E.coli*, ambas construcciones demostraron tener actividad y complementar la actividad en la cepa de selección

_ Fue posible hacer la construcción de la cepa de *E. coli* sin la actividad de fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa clase II *fbai*, la cual es fácilmente reconocible por su fenotipo: resistencia a kanamicina, sensibilidad a concentraciones de glucosa superiores a 500 ng/ml.

_ Se verificó que la cepa se complementa con la actividad del gen silvestre y también con genes que codifican para la enzima con actividad reducida. Las mutantes menos activas que fueron obtenidas por la modificación en el residuo R331 comprometido en la formación del dímero y en el reconocimiento del sustrato, permiten el crecimiento celular en concentraciones muy bajas de glucosa. Estas dos mutantes representan los límites de detección de la actividad en el sistema de selección y evidencian la efectividad del sistema para detectar actividades tan bajas.

_ Con la determinación de las condiciones en las cuales el sistema de selección puede ser empleado para detectar la actividad de la aldolasa, se puede tener confiabilidad en la recuperación de variantes de baja actividad. Lo más recomendable es utilizar diferentes condiciones de selección, de acuerdo al grado de incremento de actividad que se vaya logrando, al inicio, se buscará la recuperación de actividad vestigial, donde es recomendable emplear concentraciones celulares bajas (entre 5×10^4 y 1×10^5 UFC) para evitar que por una alta densidad celular puedan crecer y dar falsos positivos. Cuando se busquen actividades más robustas se podrá incrementar la concentración de glucosa y el número de células teniendo en cuenta que fue posible recuperar la mutante menos activa de 1 millón de células inactivas en la concentración de 500 ng/ml.

9. BIBLIOGRAFIA

ABI PRISM. Big Dye terminator cycle sequencing, Chemistry Guide Perkin Elmer. Part Number 903563. Vertion A. may 1995. The Perkin Elmer Corporation. USA

Altamirano M. M., Blackburn J. M., Aguayo C. and Fersht A. R. 2000. Directed evolution of new catalytic activity using the α/β -barrel scaffold. *Nature* **403**: 617-622

Alefounder P. A., Baldwin S. A., Perham R. and Short N. 1989. Cloning, sequence analysis and over expression of the gene for class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *Biochem J.* **257**: 529-539

Arnold F. H. 1998. Design by directed evolution. *Accounts of Chemical Research* **31** (3): 125-131

Arnold F. H. and Volkov A. A. 1999. Directed evolution of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**: 54-59

Banner D. W., Bloomer A. C., Petsko G. A., Phillips D. C., Pogson C. I., Wilson I. A., Corran P. H., Milman J. D. and Waley S.G. 1975. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically a 2.5Å^o resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**: 609-414

Berry A. and Marshall E. 1993. Identification of zinc-binding ligands in the Class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *FEBS lett.* **318** (1): 11-16

Bernstein F., Koetzle T. F., Williams G.JB, Meyer E. F., Brice M. D., Rogers J. R., Kennard O., Shimanouchi T. and Tasumi M. 1977. The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol Biol* **112**: 535-542

Black M. E., Munir K. M. and Loeb L. A. 1993. Ramdom sequence selection for generation of active recombinant molecules. *Meth. Molec. Genet* **2**: 26-43

Blundell T. 1994. Problems and solutions in protein engineering—towards rational design. *TIBTECH* **12**: 145-148

Böck A. and Neidhardt F. C. 1966. Properties of a mutant of *Escherichia coli* with a temperature-sensitive fructose-1,6-diphosphate aldolase. *Journal of Bacteriology* **92** (2): 470-476

Bork P., Gellerich J., Groth H., Hooft R., and Martin F. 1995. Divergent evolution of a β/α -barrel subclass: Detection of numerous phosphate-binding sites by motif search. *Protein Science* **4**: 268-274

Bryan P. N., Rollence M.L., and Pantoliano M. W., Wood J., Finzel B.C., Gilligan G.L., Howard A.J. and Poulos T. L. 1986. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1**: 326-334

Cadwell C. and Joyce G. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *Research* **2**: 28-33

Casadaban M.J. and Cohen S.N. 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a *Mulac* bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **76**: 4530-4533

Chen, K.Q. and Arnold, F.H. 1993. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **90**: 5618-5622

Cooper S., Leonard G., McSweeney S., Thompson A., Naismith J., Qamar S., Plater A., Berry A. and Hunter W. 1996. The crystal structure of a class II fructose-1,6-biphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold. *Structure* **4** (11): 1303-1315

Cramer A., Whitehorn E. A., Tate A. E., Stemmer W. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology* **14**: 315-319

Davis E., Jones-Mortimer M. and Henderson P. 1984. Location of a Structural Gene for Xilose-H⁺ Symport at 91 Min on the linkage Map of *Escherichia coli* K12. *The Journal of Biological Chemistry* **259** (3): 1520-1525

Doolittle, R.F. 1994. Convergent Evolution: The need to be explicit. *Trends. Biochem. Sci.* **19**: 15-18

- El Karoui M., Amunndsen S., Dabert P., and Gruss A. 1999. Gene replacement with linear DNA in electroporated wild-type *Escherichia coli*. *Nuclei Acids Research* **27** (5):1296-1299
- Farber G. K. 1993. An ($\alpha\beta$)-barrel full of evolutionary trouble. *Current Opinion in Structural Biology* **3**: 409-412
- Farber G. K. and Petsko G. A. 1990. The evolution of $\alpha\beta$ barrel enzymes. *TIBS* **15**: 228-234
- Fastrez J. 1997. In vivo versus in vitro screening or selection for catalytic activity in enzymes and abzymes. *Molecular Biotechnology* **7**: 37-55
- Fraenkel Dan. 1996 Glycolysis.p 189-197 in Neighardt F. (Ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Vol 1, second edition, Washintong, D.C.
- Greener A., Callahan M. and Jerpseth B. 1996. An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Meth. Molec. Genet.* **57**: 375-385.
- Graham L. D., Haggett K. D., Jennings P. A., Le Brocque D. S. and Whittaker R. G. and Brocque D. S. 1993. Random mutagenesis of the sustrate-binding site of a serine protease can generate enzymes with incresed activities and altered primary especificities *Bichemistry* **32**: 6259-6258
- Gutterson N. I. and D. E. Koshland.1983. Replacement and amplification of bacterial genes with sequences alteraded *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:4894-4898
- Hamilton C., Aldea M., Washburn B., Babitzke P. and Kushner S. 1989. New method for generation deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **171** (9): 4617-4622
- Harris J. L. and Craik C. S. 1998. Engineering enzyme specificity. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**: 127-132
- Hedyi H. and Gerstein M. 1999. The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome. *J. Mol Biol.* **288**: 147-164

Horowitz N. H. 1945. On the evolution of biochemical synthesis. Proc Natl Acad Sci USA **31**: 153-157

Irani M. H. and Maitra P. K. 1977. Properties of *Escherichia coli* mutants deficient in enzymes of glycolysis. Journal of Bacteriology **132**(2):398-410

Juárez G. 2000. Regeneración enzimática de una variante monomérica de la enzima *triosa fosfato Isomerasa* de *Trypanosoma brucei* mediante mutagénesis al azar. Tesis de Maestría.

Koltermann A., Ketting U., Bieschke J., Winkler T. and Eigen M. 1998. Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: High throughput screening for enzyme activity. Proc Natl. Acad. Sci. USA. **95**: 1421-1426

Kuchner O. and Arnold F. 1997. Directed evolution of enzyme catalysis. Trends in Biotech **15**: 523-530.

Makrides S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol Rev. **60**(12): 512-538

Maynard-Smith J. 1970. Natural selection and the concept of a protein space. Nature. **225**:563-564

Messing, J.B. 1977. A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. Recomb. DNA Tech. Bull. **2** (2): 43

Messing, JB. 1983. New vectors for cloning. Methods Enzymol. **101**:20-78

Murphy K.C. 1998. Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. **180** (8) 2063-2071

Nichols B. 1996. Evolution of genes and enzymes of tryptophan biosynthesis .p 2638-2648 in Neighardt F. (Ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Vol 2, second edition, Washington, D.C.

Norrander, J., Kempe, T. and Messing J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*. **26** (1):101-106)

Perham R. 1990. The fructose-1,6-bisphosphate aldolase: same reaction, different enzymes. *Isoenzymes Biochem. Soc. Trans.* **18**: 185-187

Qamar S., Marsh K. and Berry A. 1996. Identification of arginine 331 is an important active site residue in the Class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *Protein Science*. **5**:154-161

Reardon D. and Farber GK. 1995. The structure and evolution of α/β barrel proteins. *FASEB* **9**:497-503

Roberts R. W. and Ja W. W. 1999. In vitro selection of nucleic acids and proteins: What are we learning? *Current Opinion Structure Biology*. **9**(4): 521-529

Saarilahti H.T. and E. T. Palva. 1985. *In vivo* transfer of chromosomal mutations onto multi copy plasmids utilizing *pol A* strains: cloning of the *ompR2* mutation in *Escherichia coli* K12. *FEMS microbiol. Lett.* **26**: 27-33

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY

Singer M., Rossmiessl P., Cali B. M., Liebke H. and Gross C.A. 1991. The *Escherichia coli* ts8 mutation is an allele of *fda*, the encoding fructose-1,6-diphosphate aldolase. *J Bacteriol.* **173** (19):6242-6248

Singer M., Walter WA., Cali BM., Rouviese P., Liebke HH., Gourse RL and Gross CA. 1991. Physiological effects of the fructose-1,6-diphosphate aldolase ts8 mutation on stable RNA synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **173** (19):6249-6257

Skandalis A., Encell L. P. and Loeb L. A. 1997. Creating novel enzymes by applied molecular evolution. *Chemistry and Biology*. **4** (12) 889-898

Slater S. and Maurer R. 1993. Simple phage-based system for generating allele replacements in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175**: 4260-4262

Stemmer W. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**: 10747-10751

Stribling D. and Perham R. 1973 Purification and characterization of two fructose diphosphate aldolases from *Escherichia coli* (Crookes' Strain). Biochemical Journal **131**: 833-841

Suzuki M., Avicola AK., Hood L. and Loeb L.A. 1997. Low fidelity mutants in the O-helix of *thermus acuaticus* DNA polymerase I. J Biol. Chem. **272**: 11228-11235.

Sweasy, J.B. and Loeb L.A. 1993. Detection and characterization of mammalian DNA polymerase β mutants by functional complementation in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90** : 357-367

Tang, Y., Hicks J. B. and Hilvert D. 1991. In vivo catalysis of metabolically essential reaction by antibody. Proc Natl. Acad. Sci. USA. **88**:8784-8786

Thomson G., Howlett G., Ashcroft A. and Berry A. 1998. The *dhn* gene of *Escherichia coli* encodes a Class I fructose bisphosphate aldolase. Biochemical Journal. **331** (2): 437-445

Wilmanns M., Hyde C., Davies D., Kirschner K. and Jansonius J. 1991. Structural conservation in parallel α/β - barrel enzymes that catalyze three sequential reactions in the pathway of tryptophan biosynthesis. Biochemistry **30**: 9161-9169

Yano T., Oue S. and Kagamiyama H. 1998. Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. Proc Natl Acad Sci USA. **95**: 5511-5515

Zhao H. and Arnold F. H. 1997. Combinatorial protein design: strategies for screening protein libraries. Current Opinion in Structural Biology. **7**: 480-485

Zhou Y. H., Zhang X. P. and Ebright R. H. 1991. Random mutagenesis of sized DNA molecules by use of PCR with the Taq polymerase. Nucleic Acids Res. **19**: 6052