



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Contribución de los residuos de triptófano en
la fluorescencia intrínseca de la triosafosfato
isomerasa del parásito *Giardia lamblia*.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

Claudia Margarita Zarazúa Cruz.



México, D. F.

2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

Presidente: Gloria Gutiérrez Venegas.

Vocal: Felipe Cruz García.

Secretario: Gloria Hernández Alcántara.

1er Suplente: Ma. Benita Leonor Salgado.

2do Suplente: Ricardo Jasso Chávez.

El trabajo se desarrolló en el departamento de Bioquímica – Genética de la torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría con número de registro GA028/04.

El proyecto fue apoyado por los donativos de CONACYT J43022-M.

Asesor de tema:

Dra. Gloria Hernández Alcántara.

Supervisor Técnico:

QFB. María del Carmen Ortiz.

Sustentante:

Claudia Margarita Zarazúa Cruz.

DEDICATORIA.

A mi mamá Gil que siempre me apoyó en todos mis estudios pese a la mala memoria y las malas calificaciones. Por toda la paciencia que me tienes y por la que, seguro, continuarás brindándome. No sé qué hubiera hecho sin ti... tal vez me hubieran puesto a vender chicles. Nunca voy a poder pagar todo el amor que me das, pero ten por seguro que cada paso que doy es por ti y para ti. ¡Muchas gracias mamá Gil por creer en mí!

A mi papá que me ayudó a pensar en la razón de todo lo que me rodea. Creo que a ti te debo la elección de ésta maravillosa carrera. No sé qué hubiera podido estudiar de no ser para QFB. ¡Gracias Melonchín!

A mi hermano por hacerme ver que puedo continuar, por no haberme dejado renunciar a mis estudios, por las risas, por las peleas, por la compañía en esta vida. ¡Gracias Tontín! No olvides que cuando seas rico me vas a financiar mis investigaciones ¿ok?

A mi hermana que, aunque no somos las mejores amigas, no la pasamos tan mal o ¿si? Te agradezco que no me hayas matado en todo el tiempo que vivimos juntas. Una parte de ti se queda conmigo. ¡Gracias Pachaouvín! Y no creas que se me olvidó que me vas a comprar un piano cuando tengas dinero suficiente.

A mi mejor amigo que nunca me dejó sola y siempre me tendió la mano cuando más lo necesité. Cada día confirmo tu existencia. No importa que todo el mundo se ponga en mi contra, si tú sigues a mi lado, nunca me rendiré.

AGRADECIMIENTOS.

Primero a los que me apoyaron a lo largo de toda la carrera... Mis amados Chochitos.

El grupo de las cuatro. Mi querida amiga Luz (mi madre), siempre me diste confianza, seguridad, pero sobre todo una amistad sincera. Gracias por todas esas veces que me diste asilo en tu casita, por escucharme y por impulsar mis esperanzas. A mi eterna amiga Choquito por no dejarme sola, por aceptar que soy diferente, por ser mi amiga, por... todos esos momentos inolvidables. A Gaby (la chaparra) que aunque nunca sabremos si sigue viva o no, me hizo sonreír mucho y sé que cuando la volvamos a ver, la amistad seguirá intacta. Todas fueron un gran ejemplo a seguir.

Israel amigo mío (mi padre) te agradezco por tu amistad, por tus palabras, por tus abrazos, por tus sonrisas, pero sobre todo por darme la oportunidad de conocerte. "Si tú estas bien, yo estoy bien". ¡Ojalá que nuestra amistad dure tanto como lo soñamos una vez! Maldita Rata, nunca te voy a olvidar.

A Susana Quintero... ¡Jijole! Compartimos muchas cosas... ¡hasta el novio! Sin ti, seguro no hubiera entendido muchas cosas. Entendí que hasta las amigas se pueden pelear y seguir adelante. Nunca voy a poder pagarte el apoyo que me diste cuando moría por El oso. Siempre tendrás mi respeto, pero sobre todo mi amistad. A Dulce la chica más inteligente, irreverente y con un corazón enorme. Vaya que para llegar a tu IQ está MEGA cañón. Te agradezco todas las palabras de ánimo que me diste, por no dejarme sola, por ser un ejemplo a seguir, pero sobre todo por tu amistad incondicional. Al loco de Amilcar (Babotas) eres un chico impresionante, inteligente, bromista, chistoso, loco de hartar, pero sobre todo un gran amigo. Gracias a ti logré entender un poco de mi naturaleza. A Gris y a su hamster que, aunque no te funcionaba bien todo el tiempo, siempre fuiste una chica que me tendió la mano cuando lo necesité y eso siempre te lo agradeceré. A Rodrigo que fue un gran impulso, un gran apoyo y un gran amigo. Las cosas pasan por algo y ser amigos fue lo mejor que pudimos haber elegido. A Winne que me ayudó a medio aprender a bailar. Te agradezco la paciencia, pero sobre todo la amistad incondicional. Algún día aprenderé a bailar bien. A Pedrito por tu amistad incondicional y fiel, por hacerme reír cuando me sentía mal. Espero que no te pierdas. A Mago santa, me acompañaste en las buenas y en las malas, tu risa me hizo sonreír muchas veces y me ayudaste a sanar muchas heridas. A Luisier (El engendro) que me dió palabras de aliento cuando más lo necesite, por ser tan chistoso, por tantos momentos agradables. Cuida bien a mi amiga Choco ¿ok? A Dianuchis babuchis, siempre me brindaste una gran sonrisa y esas pequitas me ayudaron a sanar e impulsarme a continuar. A Okydoky que siempre nos apoyo en todo y que estoy segura que nadie va a poder olvidar las fiestas en su casa. Al rompe corazones de Aldo, eres un chico genial que me dejó algo muy bueno y estoy segura de que cambiarás al mundo. Al tierno de Edgar, me doy cuenta que existen buenos hombres en el mundo, pero más gusto me da que seas uno con Dulce. ¡Sabía que lo lograrías tarde o temprano! Batis, el mejor portero de México, pero sobre todo un maravilloso amigo. Me hiciste reír mucho y espero que la felicidad que le brindas a mi amiga dure por siempre. Cuidala mucho o te la verás conmigo ¿ok? El Capi, un gran líder. Eres un amigo increíble. A ninguno de ustedes voy a poder

olvidar y siempre estarán en mi corazón. Mi amistad es incondicional y cuenten conmigo SIEMPRE.

A mis muy entrañables Liliana y Javier. Su amistad es incomparable. Me enseñaron muchas cosas de la vida y espero de todo corazón que sigamos siendo amigos como hasta ahora. Un día seré yo quien los invite a salir. ¡Mil gracias por los momentos inolvidables!

A Adela que me hizo ver que siempre hay algo bueno en todo lo que nos pasa. ¡Gracias por tus palabras, pero sobre todo por tu sincera y honesta amistad!

A mi querida amiga Blanquita que siempre me brindó su amistad incondicional y por hacerme ver que nunca es tarde para elegir lo que más nos gusta y para luchar por ello.

A Javier Bonifaz que me mostró un lado de la vida tan diferente, donde el estar relajados y seguros de lo que somos, nos abrirá las puertas de la vida. Nunca voy a olvidarte.

A mis amigas del H. Colegio México. A mi Colega que siempre me comprendió y acompañó en eso de lo sobrenatural. Tu amistad es invaluable y sé que estaremos juntas por muchos años más. Aunque queda la duda de quién se quedará con Mulder. A mi Maldita que siempre me hizo reír hasta el brote de las lágrimas y por su amistad pese a la gran distancia que nos separa. Te extraño mucho amiga. A Yecssi una amiga fuera de serie que me ha enseñado de todo, desde cómo vestir hasta cómo luchar por lo que más quiero. De verdad que eres una de las personas más especiales que me he topado en todo mi vida. A Gaby Galicia que me brindó su comprensión, paciencia, conocimiento, pero sobre todo una sonrisa sincera. A Liliana López que es la única persona con la que puedo ser total y absolutamente sincera y a quien jamás voy a olvidar. Mi querida Enta del bien, mi amistad está intacta. A todas ustedes les agradezco su amistad y deseo que sigamos unidas por el resto de nuestras vidas.

A un gran profesor y amigo, Dr. Ricardo Jasso. Me diste momentos inolvidables y me enseñaste que teniendo un poco de confianza en mí, puedo lograr lo que quiera. Siempre haz creído en mí y eso me impulsa. Gracias por reunirnos cada viernes en tu casa para charlar, reír, jugar dominó, etc. Platicar contigo me hizo entender un poco más de la vida, pero sobre todo de mí. ¡Gracias por todos los momentos vividos!

A mi querido Mutante del bien a quien le debo más que la vida. Amigo no sé qué diablos hubiera hecho yo sin ti. Todas las veces que te veo, me enseñas algo nuevo. Me pregunto si llegará el día en el que yo te puedo aportar algo. De verdad que deseo que sigamos con esta amistad por mucho tiempo.

A Gloria, quien me enseñó lo poco que sé de la Biología Molecular. ¡Gracias por la paciencia! Y no sé cómo voy a pagarte todos los momentos tan chidos que una vez vivimos. A Dorita, amiga incondicional, tierna, linda, inteligente y buena persona. A Carmelita quien me tuvo mucha paciencia y además me brindó buenos consejos. A Sarita que me hizo reír mucho y que me ayudó a reflexionar sobre la vida. A Sergio, quien me enseñó que el que persevera alcanza. A Nacho, tu cerebro es de oro puro. Gracias por todo.

A Jaime, quien me brindó los abrazos más grandes, la ternura que solo él puede dar, por mi primer concierto de JAZZ, por brindarme la oportunidad de conocerlo y sobre todo por permitirme compartir algo de su felicidad. Espero que te haya aportado algo porque tú a mí, me enseñaste muchas cosas buenas de la vida. Mi amistad estará siempre ahí para ti. Me hubiera gustado volver a ver tu Mustang verde.

A Angelito de mi corazón por ser un apoyo, un amigo, un hombro donde llorar, un ejemplo a seguir, un cómplice, por ser todo y nada. Por brindarme alegría, paz y amor. La vida está llena de cosas buenas y tú eres una de esas. Gracias por los momentos buenos y malos y deseo de todo corazón que siempre seas muy feliz.

A los profesores Carlos Amador Bedolla, Guillermo Antonio Segura Espinosa, Lino Joel Reyes Trejo y Marco Antonio Cerbón Cervantes y a las profesoras Ruth Edith Martín Fuentes, Ma. Del Carmen Cortés Decuir, Alicia Cervantes Peredo, Marisol López López y Ma. De los Dolores Campos Echeverría; quienes me enseñaron mucho más que ciencia.

Al Dr. Gabriel López Velásquez quien me mostró que es mejor ver el lado bueno a las cosas que nos suceden en la vida. Al Dr. Horacio Reyes Vivas, quien me enseñó que no importa cuántas veces me caiga sino las veces que me levante, pero sobre todo lo que se aprende de cada caída. ¡Gracias por ayudarme!

A “Los Cruz” que me brindaron su apoyo. A mis queridos primos Yuliana, Rober y José Roberto que me han acompañado a lo largo de mi vida. ¡Son los mejores!

A “Los Nagasaki” que me dieron ánimos cuando me veían mal. ¡Gracias por el arroz!

A la ciencia por permitirme vivir la pasión por la vida. Mi verdadero amor.

*El corazón es el centro
que se dispersa en prismas
para formar una estrella
de cuya dorada luz nace
el porqué de la vida.*

*Esa estrella es el amor y
eres tú quien la ilumina.*

Emilio Rojas.
Pequeño Hombre.

ÍNDICE.	Página.
RESUMEN.	13
INTRODUCCIÓN.	14
A) Importancia de <i>Giardia lamblia</i> en la salud.	14
a) Infección.	14
b) Tratamiento.	16
c) Metabolismo.	16
B) Importancia de la TIM en la vía glucolítica.	16
C) Generalidades de la TIM.	18
a) Residuos catalíticos.	18
b) Estructura que adopta la enzima.	19
D) Posición de los residuos de triptófano en GITIM.	21
E) Fluorescencia.	24
a) Concepto de fluorescencia.	24
b) Fluorescencia en proteínas.	25
c) Parámetros en la fluorescencia.	25
d) Perspectiva de los triptófanos en la fluorescencia.	25
ANTECEDENTES.	26
JUSTIFICACIÓN.	29
HIPÓTESIS.	29
OBJETIVOS.	29
A) General.	29
B) Particular.	29
METODOLOGÍA.	30
1. Purificación del ADN.	30
2. Diseño de los oligonucleótidos mutagénicos.	30
3. Mutagénesis dirigida por PCR.	31
3.1 Breve descripción.	31
3.2 Condiciones experimentales.	32
4. Restricciones.	33
5. Ligación.	33
6. Obtención del vector pET-3a.	33
7. Transformación en bacterias <i>E. coli</i> de la cepa TOP-10.	34
8. Secuenciación.	34
9. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> de la cepa BL21(DE3)pLysS para sobreexpresión.	34
10. Sobreexpresión.	35
10.1 Promotor T7.	35
10.2 Condiciones de sobreexpresión.	35
11. Purificación.	35
11.1 Purificación parcial.	36
12. Cuantificación de proteína.	36
13. Cinética.	36
14. Fluorescencia intrínseca.	37

RESULTADOS.	38
i. Obtención de genes mutantes.	38
ii. Sobreexpresión de GITIM y las mutantes W75F, W162F, W173F y W196F.	41
iii. Purificación.	42
iv. Cinética.	43
v. Evaluación de la fluorescencia intrínseca.	44
DISCUSIÓN.	45
CONCLUSIONES.	50
PERSPECTIVA.	50
BIBLIOGRAFÍA.	51
APÉNDICE.	56
Apéndice I: Fluorescencia.	56
Apéndice II: Geles de agarosa 1 %.	61
Apéndice III: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	61
Apéndice IV: Células competentes.	64
Apéndice V: Cuantificación de proteína por el método del Ácido Bicinconínico.	65
Apéndice VI: Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.	66

ÍNDICE DE FIGURAS.

	No. Figura.	Página.
La transferencia de electrones en <i>Giardia lamblia</i> y el mecanismo de activación del metronidazol.	1	15
Esquema general de la vía glucolítica.	2	17
Mecanismo de la interconversión de DHAP a GAP por la TIM.	3	19
Monómero de GITIM donde se acentúan los residuos catalíticos.	4	20
Monómero de GITIM donde se acentúan los residuos de triptófano.	5	22
Alineamiento de GITIM, TbTIM, TcTIM, EhTIM, LmTIM, PftTIM y HuTIM.	6	23
Secuencia de GITIM.	7	31
Esquema de cómo se lleva a cabo la mutagénesis dirigida por PCR.	8	32
Diagrama de flujo del procedimiento que se llevó a cabo para realizar la sobreexpresión.	9	35
Gel de agarosa al 1 % con gen de GITIM	10	38
Geles de agarosa al 1 % con productos de los PCR-1 y PCR-2 cada mutante.	11	39
Gel de agarosa al 1 % con producto de PCR-3 y digestiones con NdeI-BamHI.	12	40
Gel de agarosa 1 % con clona positiva.	13	41
Gel de SDS-PAGE con sobreexpresiones a 30 y 37 °C.	14	42
Gel de poliacrilamida con proteínas purificadas.	15	43
Espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína GITIM y las diferentes mutantes.	16	44
Acercamiento en la región de la interfase.	17	47
Monómero de GITIM donde se exhiben los residuos de triptófano con un acercamiento del W162 y el W196.	18	49
Esquema general de los componentes de un espectrofluorómetro.	19	58
El sistema del monocromador.	20	59

ÍNDICE DE TABLAS.

	No. Tabla.	Página.
Nombre, volumen y estructura de tres aminoácidos aromáticos.	1	26
Resumen de antecedentes de TbTIM y PftTIM.	2	28
Características de oligonucleótidos para cada mutante.	3	31
Tamaño de los productos de amplificación de los diferentes PCR's de la mutagénesis.	4	39
Parámetros cinéticos.	5	43
Datos de fluorescencia intrínseca.	6	44
Concentraciones de reactivos para BCA.	7	65
Composición de geles de poliacrilamida.	8	66

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

% IF	Porcentaje de intensidad de fluorescencia.
α-GDH	α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.
μM	Micromolar.
λ_{\max}	Longitud de onda máxima de emisión.
a	Adenina.
ADN	Ácido Desoxiribonucleico.
ADP	Adenosin difosfato.
ALDO	Aldolasa.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosin trifosfato.
BCA	Ácido Bicinconico.
BSA	Abúmina sérica bovina.
c	Citosina.
DHAP	Dihidroxicetonafosfato.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
dNTP	Desosirribonucleótidos.
DTT	Ditio treitol.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EhTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Entamoeba histolytica</i> .
ENO	Enolasa.
FdI	Ferredoxin I.
FNR	NAD(P)H oxidoreductasa.
Fw	Foward.
g	Guanina.
G3PDH	Gliceraldehído – 3 – fosfato deshidrogenasa.
GAP	Gliceraldehído – 3 – fosfato.
GdnHCl	Hidrocloruro de guanidinio.
GITIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Giardia lamblia</i> .
H₂O_d	Agua destilada.
HK	Hexocinasa.
HuTIM	Triosafosfato isomerasa de Humano.
IF	Intensidad de fluorescencia.
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
k_{cat}	Constante catalítica.
K_m	Constante de Michaelis-Menten.
LB	Medio de cultivo Luria Bertani.
LmTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Leishmania mexicana</i> .
M	Molar.
mM	MiliMolar.
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.
MP	Marcador de peso.
NAD⁺	Dinucleotido de nicotinamida (forma oxidada).
NADH	Dinucleotido de nicotinamida (forma reducida).

nm	Nanómetros.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
pb	Pares de bases ó peso esperado.
PBS	Solución tamponada de fosfatos.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PF	Fosfofructosa.
PFOR	Piruvato ferredoxin oxidoreductasa.
PfTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Plasmodium falciparum</i> .
PGI	Fosfoglucosa isomerasa.
PGK	Fosfoglicerato.
PGKM	Fosfoglicerato mutasa.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil.
PVK	Piruvato cinasa.
RNO₂	Grupo nitro del metronidaol.
Rv	Reverse.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.
t	Timina.
TBE	Solución tris Borato EDTA
TbTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i> .
TcTIM	Triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> .
TE	Trietanolamina + EDTA.
TIM	Triosafosfato isomerasa.
T_m	Temperatura de alineamiento.
UV	Luz Ultra violeta.
V_{max}	Velocidad máxima.

SÍMBOLOS DE LOS AMINOÁCIDOS.

Una letra.	Tres letras.	Aminoácido.
A	Ala	Alanina.
B	Asx	Asparagina o ácido aspártico.
C	Cys	Cisteína.
D	Asp	Ácido aspártico.
E	Glu	Ácido glutámico.
F	Phe	Fenilalanina.
G	Gly	Glicina.
H	His	Histidina.
I	Ile	Isoleucina.
K	Lys	Lisina.
L	Leu	Leucina.
M	Met	Metionina.
N	Asn	Asparagina.
P	Pro	Prolina.
Q	Gln	Glutamina.
R	Arg	Arginina.
S	Ser	Serina.
T	Thr	Treonina.
V	Val	Valina.
W	Trp	Triptófano.
Y	Tyr	Tirosina.
Z	Glx	Glutamina ó ácido glutámico.

RESUMEN.

La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica que cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído 3-fosfato (GAP). La TIM se ha propuesto como blanco para el diseño de compuestos inactivadores específicos de especie en algunos parásitos.

Aunque se cuenta con estudios sobre la inactivación de la TIM de *Giardia lamblia* (GITIM) por el efecto de agentes derivatizantes de cisteínas, se sabe muy poco sobre los cambios estructurales que estos provocan. Los cambios de fluorescencia intrínseca de fluoróforos como el triptófano debido a su exposición al solvente, se utilizan para monitorear cambios estructurales en una gran variedad de proteínas. En el presente trabajo analizamos las propiedades fluorescentes de los 4 residuos de triptófano que presenta GITIM; cada uno de ellos se sustituyó por fenilalanina mediante mutagénesis dirigida. Las mutantes sencillas que se analizaron fueron: W75F, W162F, W173F y W196F. La expresión de estos se realizó en un sistema bacteriano, mientras que su purificación se llevó a través de métodos cromatográficos.

Las constantes cinéticas de cada una de las mutantes se determinaron. Al analizar los datos se observó que no hubieron cambios significativos con respecto a la proteína nativa, indicando que la inserción de la mutación no afecta el sitio catalítico de GITIM.

Los espectros de emisión de fluorescencia excitando a 295 nm mostraron que el W75 y W173 no contribuyen a la fluorescencia intrínseca de la enzima; mientras que el W162 contribuye con el 50 % en GITIM. En cuanto al W196 se observó que cuando no esta presente, la fluorescencia se incrementa más de un 100 %, posiblemente porque el W196 apaga la fluorescencia de otro residuos de triptófano cercanos. Al analizar la estructura terciaria de GITIM se puede observar que el par de triptófanos más cercanos entre sí son el 162 y el 196.

INTRODUCCIÓN.

A) **Importancia de *Giardia lamblia* en la salud.**

Giardia lamblia, también llamada *G. duodenalis*, o *G. intestinalis*, es el protozoo flagelado más comúnmente identificado en el tracto intestinal⁴³. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 280 millones de personas se infectan al año. La incidencia de giardiasis puede ser mayor en niños que residen en países en vías de desarrollo, y decrece del 2 al 7 % en algunas naciones industrializadas⁴³. La infección puede presentarse desde la lactancia, pero tiene sus picos máximos en los preescolares y escolares.

a) ***Infeción:***

El parásito se ingiere en su forma de quiste (forma infectiva), y se desenquista en el medio ácido del estómago dando lugar al trofozoito (forma activa). Este último se instala en la mucosa del duodeno o del yeyuno y se reproduce por fisión binaria⁴³. Los quistes son eliminados en las heces y según los estudios de brotes epidémicos acaecidos en varios países, se demostró que el agua tiene un papel importante en la transmisión, además cualquier alimento, fomites y moscas, pueden servir como vehículos¹⁶.

b) ***Tratamiento:***

Existe un número notable de fármacos para el tratamiento de los pacientes con giardiasis. La mayoría de éstos responden a un curso único de tratamiento, especialmente cuando se administran nitroimidazoles como el metronidazol, tinidazol y ornidazol^{41, 43}.

El metronidazol, por ejemplo, puede modificarse selectivamente a una forma activa por algunas bacterias. Este compuesto contiene un grupo nitro que debe ser parcialmente reducido para que la molécula se vuelva activa. La reducción total del estado amino inactiva nuevamente a la molécula. Las bacterias anaerobias producen la reducción parcial, lo que rara vez logran las células del cuerpo humano o las bacterias aerobias. Esto es, la piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR) decarboxila al piruvato y reduce a la Ferredoxin I (FdI), quien a cambio dona electrones a una ferredoxin putativa: NAD(P)H oxidoreductasa (FNR). El parásito es protegido del daño oxidativo por la NADH oxidasa, quien reduce oxígeno directamente a agua. El grupo nitro del metronidazol (RNO₂) es reducido a un radical nitro via reducción de FdI. El radical además podría sufrir una serie

de reducciones para formar nitroso nocivo y radicales hidroxilamino, finalmente formando el inofensivo amino o podría sufrir descomposición para formar un radical imidazol y ion nitrito ⁴² (Fig. 1).

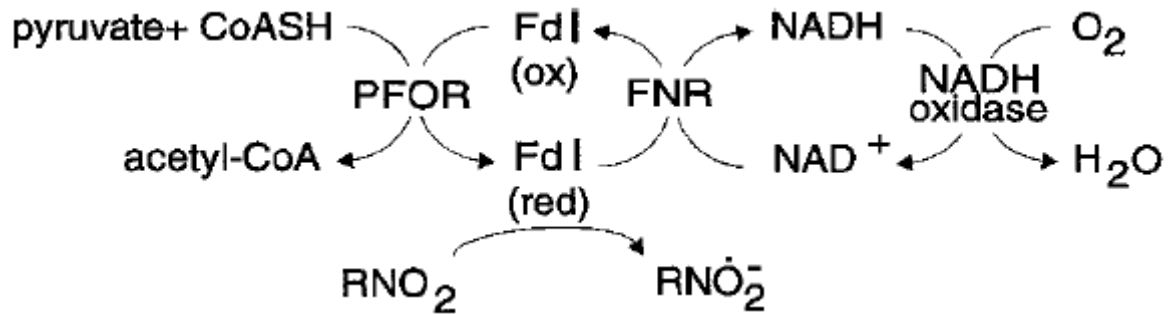


Figura 1. La transferencia de electrones en *Giardia lamblia* y el mecanismo de activación del metronidazol ⁴².

Los radicales tóxicos presumiblemente reaccionan con componentes esenciales de la célula. Se ha propuesto que la unión de los radicales libres al ADN, es el mecanismo por el cual el parásito muere ⁴². Éste es un ejemplo de síntesis letal porque las moléculas de ADN que contienen metronidazol son inestables. De esto se deduce que el metronidazol y los fármacos relacionados son particularmente útiles contra las bacterias anaerobias y contra las amebas, que también crecen de forma anaerobia. *G. lamblia* se le considera un parásito microaerófilo debido a que tiene un comportamiento homólogo con los microorganismos anaerobios. Este parásito presenta las proteínas necesarias para reducir al metronidazol e incorporarlo al ADN de *G. lamblia* ⁴².

Sin embargo, los nitroimidazoles no son ideales. En menor medida la reducción parcial a los agentes activos ocurre en los tejidos normales, lo que conduce a la posible mutagénesis y probablemente a la carcinogénesis ³⁶. Es importante mencionar que existen reportes de cepas resistentes de *G. lamblia* a metronidazol ^{41,43}, por lo que se está estudiado más a fondo dicho parásito y finalmente encontrar una manera de eliminarlo sin dañar al huésped.

c) *Metabolismo:*

Se sabe que *G. lamblia* presenta remanentes mitocondriales llamados mitosomas^{13, 40}, que no realizan la fosforilación oxidativa. *G. lamblia* lleva a cabo la glucólisis, siendo esta su vía principal para obtener ATP. Por lo que se ha propuesto el diseño de fármacos dirigidos hacia alguna enzima de la vía glucolítica, no sólo en *G. lamblia* sino también en otros parásitos como *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica* y *Plasmodium falciparum*^{11, 34, 21}. La enzima de la glucólisis que se ha estudiado con mayor énfasis en estos microorganismos es la triosafofato isomerasa (TIM ó TPI).

B) Importancia de la TIM en la vía glucolítica.

La TIM es una enzima glucolítica ubicua que cataliza la interconversión entre Dihidroxiacetonafofato (DHAP) y Gliceraldehído – 3 – fosfato (GAP) (Fig. 2).

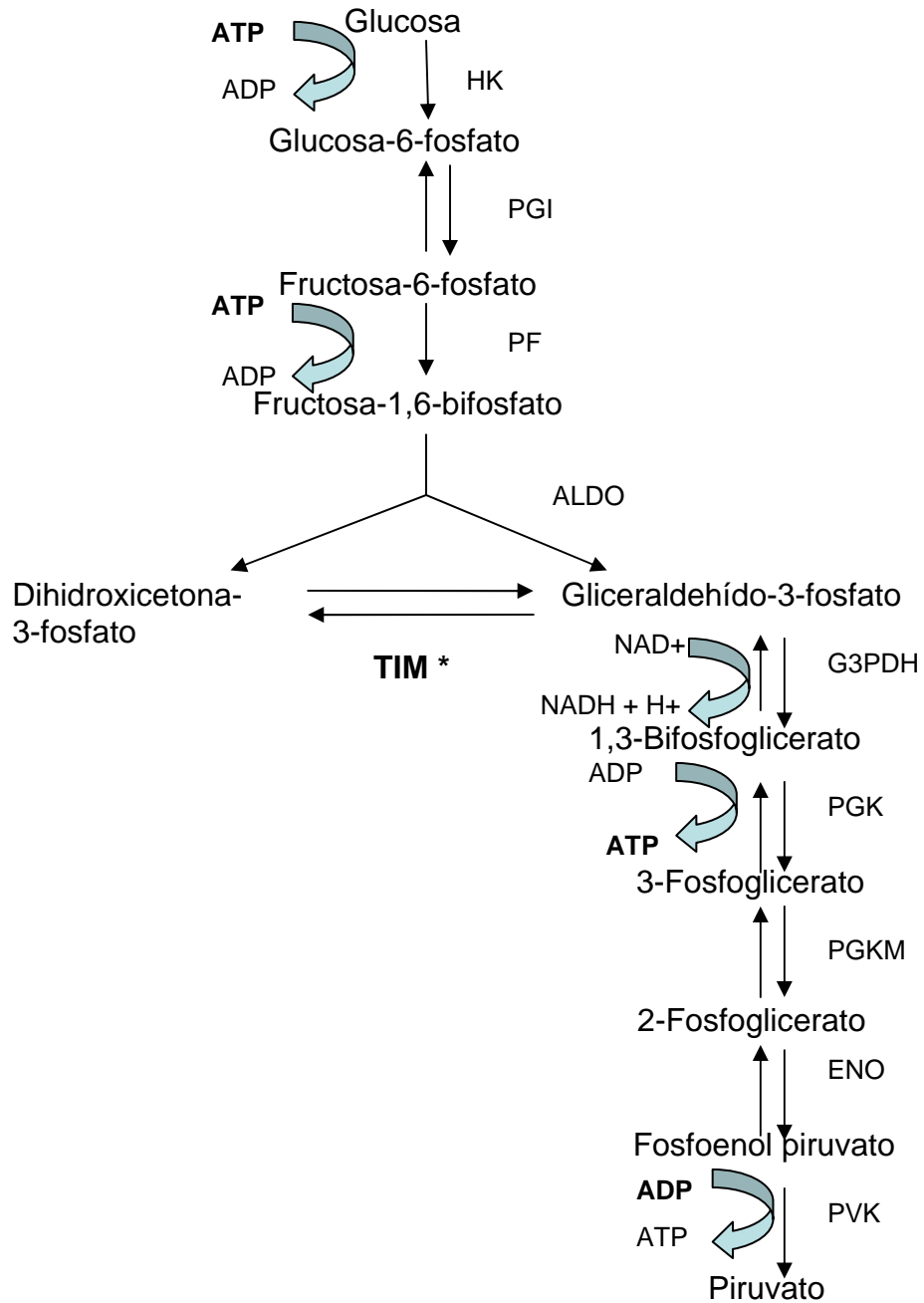


Figura 2. Esquema general de la vía glucolítica El asterisco señala la TIM. Donde HK = Hexocinasa, PGI = Fosfoglucosa isomerasa, PF = Fosfofructosa, ALOD = Aldolasa, TIM = Triosafosfato isomerasa, G3PDH = Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada, PGK = Fosfoglicerato, PGKM = Fosfoglicerato mutasa, ENO = Enolasa y PVK = Piruvato cinasa.

Posterior a la reacción de la TIM conforme el GAP se utiliza en la reacción siguiente de la vía glucolítica, más DHAP se transforma en GAP para que estos dos compuestos mantengan su relación de equilibrio. En este punto, la glucosa se ha transformado en dos moléculas de GAP, finalizando así la fase preparatoria de la glucólisis. Hasta aquí se han consumido dos moléculas de ATP. Sin embargo, esta inversión permite transformar una glucosa en dos unidades de triosasfosfato, cada una de las cuales tiene un grupo fosforilo que puede convertirse en un compuesto de “alta energía”, cuya energía libre de hidrólisis puede acoplarse a la síntesis de ATP. Esta inversión en energía será devuelta con el doble de moléculas de ATP usadas, en la etapa final de la glucólisis. Las dos unidades de triosas fosforiladas son transformadas en dos moléculas de piruvato, con la síntesis acoplada de cuatro moléculas de ATP por molécula de glucosa ⁴⁵.

Por lo tanto, si se inhibe la acción de la TIM como lo han propuesto algunos grupos de investigación, sólo se obtendrían 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa, las cuales únicamente servirían para reiniciar la glucólisis. En estas condiciones, el parásito no podría desarrollarse adecuadamente a falta de la producción de una molécula de GAP ^{11, 8, 34}.

C) Generalidades de la TIM

a) *Residuos catalíticos:*

Para que la GlTIM lleve a cabo la interconversión entre DHAP y GAP, se requiere de la participación de tres residuos del sitio catalítico: el ácido glutámico situado en la posición 170, cuyo carboxilo actúa como base, substrayendo un protón del sustrato; la histidina de la posición 96, cuyo anillo imidazol actúa como electrófilo, polarizando el grupo carbonilo del sustrato y permitiendo su enolización. El tercer residuo es la lisina de la posición 13, que es responsable de la especificidad de la enzima por su sustrato natural ¹² (Fig. 3).

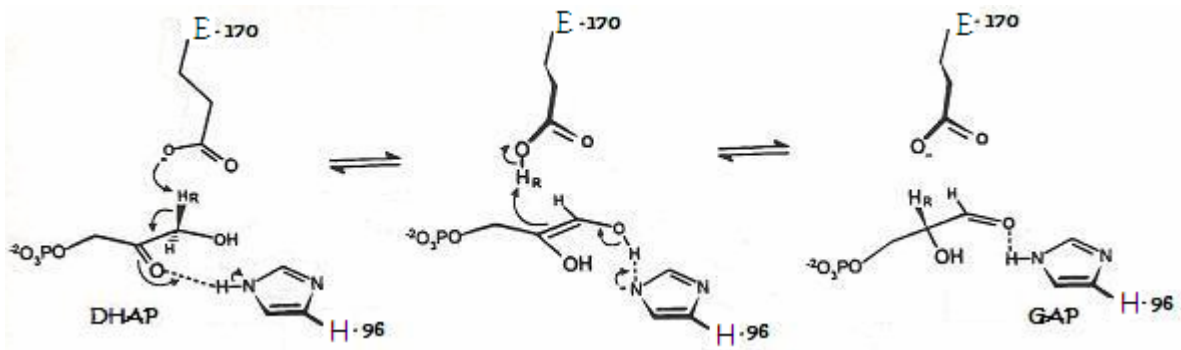


Figura 3. Mecanismo de la reacción de DHAP a GAP por la TIM.

b) Estructura que adopta la enzima:

La TIM tiene una estructura denominada barril $(\alpha/\beta)_8$ debido a la conformación tridimensional que adopta, similar a un barril que contiene 8 hojas- β plegadas al centro, y rodeadas cada una de ellas por una α hélice. Ambas estructuras están unidas entre sí por asas, las cuales juegan un papel importante tanto en la integridad como en la catálisis de la enzima. Su sitio activo se localiza en la región central del barril $(\alpha/\beta)_8$ (Fig. 4). Dentro de las asas más importantes mencionamos el asa tres y seis. Al asa tres se le ha denominado asa de interfase o asa de interdigitación que contiene los residuos 64 al 80 (Fig. 5). De igual modo tenemos el asa 6, también llamada asa catalítica que incluye los residuos 173 al 182 (Fig. 5).

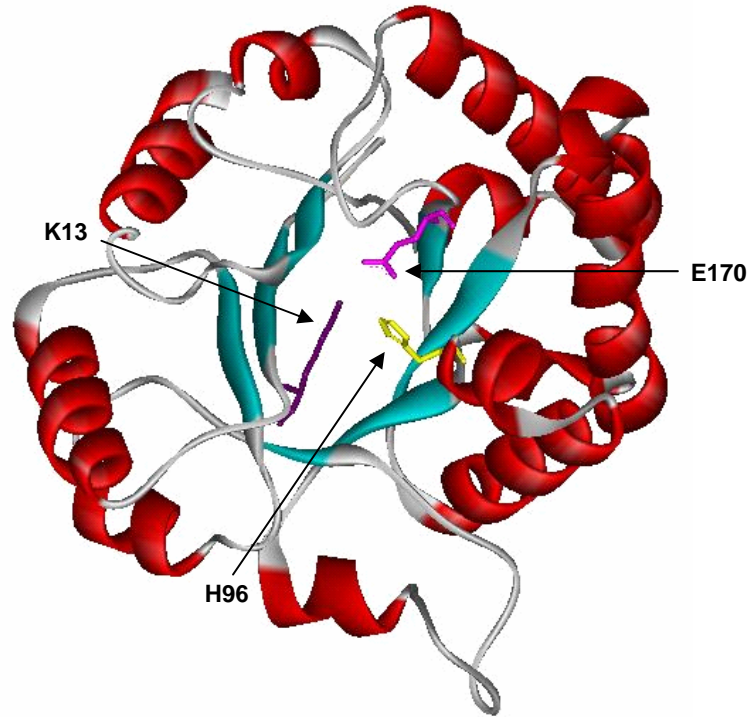


Figura 4. Monómero de la TIM, donde se muestran las β -plegadas, las α -hélices, las asas, la K13, la H96 y finalmente el E170.

Un monómero de TIM se encuentra conformado en promedio por 250 residuos de aminoácidos ³⁰. Es una enzima que generalmente se encuentra formando dímeros; sin embargo, en algunos organismos hipertermófilos como *Pyrococcus woesei*, *Methanothermus fervidus* y *Thermoproteus tenax*, se encuentra como un tetramero ¹⁸.

López-Velázquez y cols, (2004) demostraron que la TIM de *G. lamblia* (GITIM), presenta distintos estados oligoméricos; es decir, en forma dimérica y tetramérica. El tetramero se constituye a través de la generación de un dímero de dímeros unido por puentes disulfuro entre dos monómeros ^{21, 33}.

D) Posición de los residuos de triptófano en GITIM.

Es de gran interés el estudio de los residuos de triptófano debido a que pueden utilizarse como una sonda para monitorear cambios conformacionales de las proteínas. Con ayuda de la espectroscopia de fluorescencia (Ver apéndice I) los Triptófanos proporcionan información de la estructura terciaria en distintas regiones de la molécula. Generalmente los residuos de W se localizan en distintas posiciones en la estructura de una proteína.

La fluorescencia intrínseca de las proteínas se utiliza frecuentemente para monitorear cambios en los residuos aromáticos durante la disociación y/o desnaturalización de las proteínas inducida por urea, hidrocloreuro de guanidinio (GdnHCl) y/o temperatura, durante la unión de un ligando o en presencia de un compuesto inactivador. En muchos casos también es factible incorporar residuos de W a la secuencia primaria de las proteínas.

Actualmente se conoce la localización, orientación y ambiente de los diferentes aminoácidos de GITIM; ya que nuestro grupo resolvió la estructura cristalográfica de dicha proteína. Además del cristal de GITIM³³ se han cristalizado 14 estructuras para otras TIMs 1, 2, 3, 4, 7, 20, 22, 24, 25, 29, 34, 44, 46, 47, 49. Una característica importante es que GITIM tiene cuatro residuos de W en las posiciones: 75, 162, 173 y 196.

El W75 se encuentra en la punta del asa 3, al lado de una región altamente conservada en las TIMs, la secuencia TGE (residuos 76, 77 y 78; Fig. 6). El residuo E78 a veces se encuentra como D en algunos parásitos. Se sabe que la secuencia TGE permite estabilizar la interacción entre subunidades. A esta zona de interacción denominada como interfase se le considera muy importante para la estabilidad de la proteína³⁸. Por lo tanto el W75 puede ser de gran utilidad para monitorear la región de la interfase en GITIM.

El W173 se encuentra en el asa 6, mientras que el W162 se localiza en una α -hélice 3-10, entre la α -hélice 5 y hoja- β 6. El W196, está localizado en la α -hélice 6 (Fig. 5).

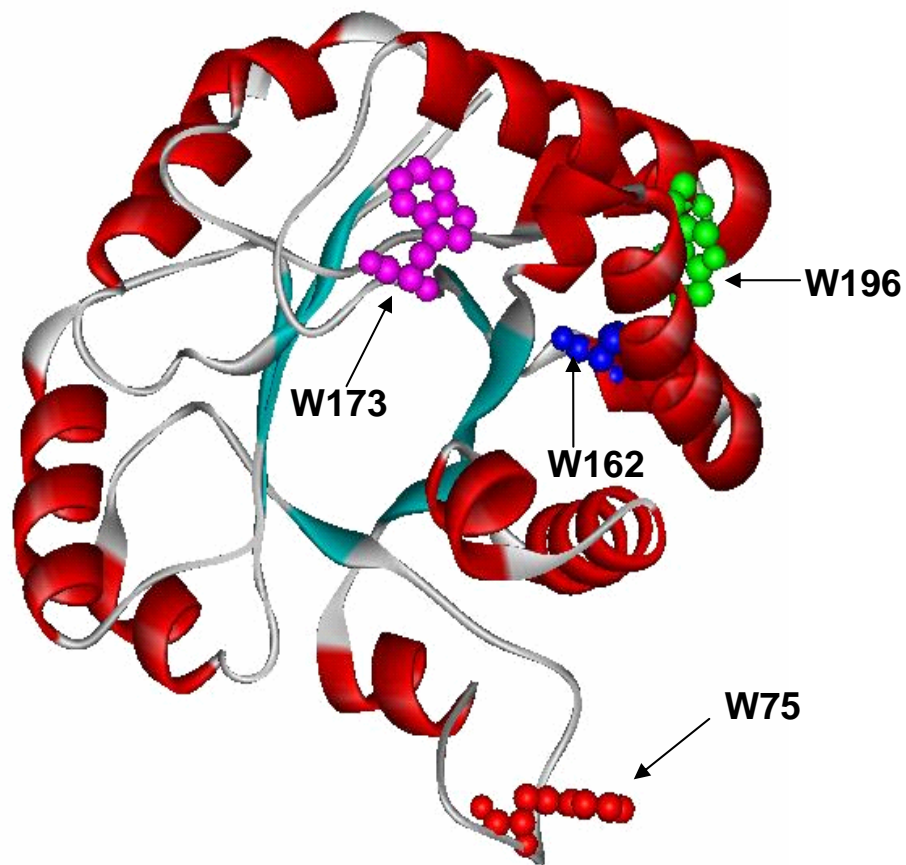


Figura 5. Monómero de GITIM donde se acentúan los residuos de triptófano. El W75 en color rojo, el W162 en color azul, el W173 en color rosa y finalmente el W196 en color verde.

En la Figura 6 se alinearon las secuencias de la TIM de diferentes microorganismos: *Trypanosoma brucei* (TbTIM), *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), *Entamoeba histolytica* (EhTIM), *Leishmania mexicana* (LmTIM), *Plasmodium falciparum* (PfTIM) y también la de Humano (HuTIM).

En cuanto al triptófano que se encuentra en la posición 173, es muy conservado en todas las especies. Sin embargo, es importante mencionar que en algunos organismos termofílicos en su lugar tienen un E o D.

E) Fluorescencia.

Para tener una mayor comprensión de los datos de fluorescencia intrínseca, es importante tener claro el concepto de fluorescencia y su relación con los residuos de W en las proteínas (Ver apéndice I).

a) Concepto de fluorescencia:

La absorción de la energía radiante por un átomo puede ocasionar la ionización de este último, o producir su excitación electrónica. En este trabajo estamos interesados en la última posibilidad. Un átomo excitado electrónicamente tiene un periodo de vida de unos 10^{-7} a 10^{-8} segundos. Si entonces el átomo no sufre colisión con otra partícula a la cual puede pasar algo de su energía excesiva, se producirá una emisión de esta energía en forma parcial o total, y a este fenómeno se le conoce con el nombre de fluorescencia. Cuando los electrones excitados regresan a su condición inicial y emiten una radiación de frecuencia idéntica a la absorbida, obtenemos una fluorescencia de resonancia. Sin embargo, el electrón puede pasar también a un nivel energético intermedio entre los estados base y de excitación. La frecuencia de la fluorescencia emitida, ν' , será menor que la luz absorbida, ν . En raras ocasiones ν' es mayor que ν , es decir, se emite más energía radiante de la que se absorbe. Si así sucediera es evidente que alguna energía cinética se convirtió en energía de movimiento interno que se irradia junto con la energía de excitación del átomo²⁶. Es por esto que la fluorescencia es una excelente prueba para investigar cambios conformacionales de proteínas.

b) Fluorescencia en proteínas:

La fluorescencia que presentan las proteínas se debe a los aminoácidos que tienen grupos aromáticos como son: F, Y y W (Tabla 1). En el caso de las proteínas que tienen estos tres residuos (F, Y y W), la mayor contribución a la fluorescencia de la proteína se debe a los residuos de W. Esto se debe a que su absorbancia es mucho mayor que la de F y Y ⁶. Por esto se emplea más a la fluorescencia del W como parámetro de estudio de las proteínas.

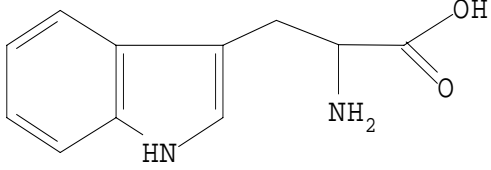
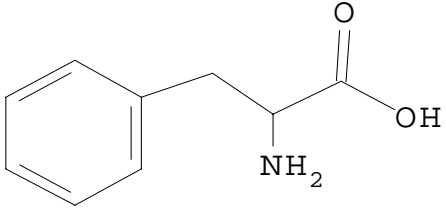
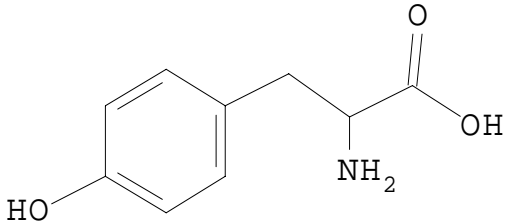
c) Parámetros en la fluorescencia:

Los parámetros que se deben tomar en cuenta cuando se realizan mediciones de fluorescencia son: la longitud máxima de emisión, el tiempo de vida y la eficiencia cuántica. La longitud máxima de emisión es aquella longitud de onda en la que el fluoróforo tiene su máximo de fluorescencia. El tiempo de vida determina el tiempo disponible para que el fluoróforo interactúe en su medio ambiente; de ahí la información disponible de su emisión. Finalmente la eficiencia cuántica es el número de fotones emitidos relativos al número de fotones absorbidos ¹⁹.

d) Perspectiva de los Triptófanos en la fluorescencia:

Con el análisis de los Triptófanos se pueden obtener datos que proporcionen los cambios conformacionales que sufren las proteínas. Para asegurarse de que la fluorescencia observada sea emitida solo por estos residuos, es necesario excitar las proteínas a 295 nm o longitudes de onda más largas, donde la Y y la F no absorben. Cabe mencionar que la longitud de onda máxima de emisión del W libre en solución acuosa es de alrededor de 352 nm y comienza a ser menor cuando el W se encuentra en un solvente apolar o en un ambiente hidrofóbico. Entonces se puede decir que cuando se encuentra en un ambiente de este tipo, el espectro del W se corre al azul; es decir, disminuye su longitud de onda máxima de emisión ³⁵.

Tabla 1. Nombre, volumen y estructura de tres aminoácidos aromáticos ⁶.

<i>Aminoácido.</i>	<i>Volumen de Van der Waals (Å³).</i>	<i>Estructura.</i>
<i>Triptófano (Trp ó W).</i>	163	
<i>Fenilalanina (Phe ó F).</i>	135	
<i>Tirosina (Tyr ó Y).</i>	141	

ANTECEDENTES.

Actualmente se han realizado estudios de fluorescencia intrínseca en TIMs como TbTIM, la cual tiene 5 residuos de W en las posiciones 12, 90, 159, 170 y 193. Para conocer la contribución que tiene cada uno de estos residuos en la fluorescencia intrínseca de la enzima, se realizaron mutantes de W que se sustituyeron por F mediante mutagénesis dirigida por PCR⁵. Una mutante sencilla indica que solo se sustituyó uno de los residuos de W por una F, una mutante doble indica que se sustituyeron dos residuos de W por F. Solo se obtuvieron dos mutantes sencillas (W12F y W159F) y una mutante doble (W12F/W193F). Con las mutantes W90F, W170F y W193F se tuvieron problemas en la sobreexpresión y no pudieron obtenerse. Estudios de dicroísmo circular demostraron que las mutantes W12F, W159F y W12F/W193F contenían una estructura secundaria similar a la silvestre. También observaron que los parámetros cinéticos de estas tres mutantes eran muy similares a la silvestre, indicando así que no ocurrieron mayores cambios en el sitio catalítico. En cuanto a la fluorescencia se observó que las tres mutantes y la silvestre tenían la misma longitud de onda máxima de emisión ($\lambda_{\text{max}} = 322 \text{ nm}$). Los espectros de fluorescencia de la mutante W12F mostraron que el W12 contribuye con un 40 % de la intensidad de fluorescencia de la proteína silvestre. Para el caso de la mutante W159F se observó un espectro de emisión esencialmente idéntico al de la silvestre, sugiriendo que el W159 no contribuye al espectro de fluorescencia intrínseca de la enzima silvestre. En el caso de la doble mutante W12F/W193F, el espectro de fluorescencia mostró un decaimiento de sólo un 20 % en la intensidad. En este caso los autores propusieron que el W de la posición 193 podría estar apagando la fluorescencia de otro residuo de W. Para corroborar dicha hipótesis, determinaron las distancias que existen entre el W193 y cada uno de los Triptófanos presentes. Así, encontraron las siguientes distancias: W193 – W12 33.0 Å; W193 – W90 20.2 Å; W193 – W170 22.3 Å y W193 – W159 6.1 Å. De modo que el W que podría estar apagando el W193 es el W159 debido a que se encuentra a una menor distancia en comparación con los Triptófanos restantes. Sin embargo, la hipótesis del apagamiento de la fluorescencia por el par 159-193 no se corroboró totalmente por carecer de la mutante sencilla W193F⁵. Además, el análisis de los datos de fluorescencia permitió proponer qué regiones se exponen a lo largo del desplegamiento por GdnHCl en TbTIM.

Por otro lado, Pattanaik y col (2003) estudiaron la contribución de los Triptófanos en PftTIM. Esta enzima cuenta con dos residuos de W en las posiciones 11 y 168 (Fig. 6). El W de la posición 168 es el equivalente al W173 en GITIM. El W11 es parte del segmento amino-terminal de la interfase del dímero (equivalente al W12 en TbTIM). En este estudio, se realizaron mutantes que sólo contenían un residuo de W, lo que les permitió estudiar las propiedades de cada fluoróforo en la proteína. Los parámetros cinéticos mostraron que las dos proteínas mutantes eran similares a la silvestre. También realizaron estudios de dicroísmo circular donde se demostró que las enzimas mutantes y la silvestre presentaron una estructura secundaria similar. En el caso de la silvestre y la mutante W168F tuvieron un λ_{\max} de 331 y 332 nm, respectivamente; mientras que la mutante W11F emitió a 321 nm (corrimiento de 10 nm al azul). En cuanto a la fluorescencia intrínseca observaron que la mutante W11F presentaba un decaimiento del 70 % de intensidad de fluorescencia en comparación con la silvestre. La intensidad de fluorescencia de la mutante W168F disminuyó un 30 %. Tanto para el caso de TbTIM como para PftTIM, los autores concluyeron que el W12 y W11, respectivamente, son los responsables de la mayor contribución a la fluorescencia intrínseca de dichas proteínas.

Tabla 2. Resumen de antecedentes de TbTIM y PftTIM.

Enzima.	Número de Triptófanos.	Proteínas obtenidas.	Parámetros cinéticos.			Fluorescencia.	
			K_m (mM).	k_{cat} (min^{-1}) $\times 10^5$.	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) $\times 10^5$.	λ_{\max} (nm).	%IF (%).
TbTIM	5	TbTIM silvestre	0.2	0.87	4.3	322	100
		W12F	0.34	0.76	2.2	322	40
		W159F	0.28	1.07	6.3	322	*
		W12F/W193F	0.65	1.12	1.7	322	20
PftTIM	2	PftTIM silvestre	0.39	2.68	6.9	331	100
		W11F	0.33	1.55	4.7	321	70
		W168F	0.33	1.57	4.7	332	30

* Similar a TbTIM silvestre.

En el 2002 Rodríguez-Romero y cols, estudiaron la TIM de EhTIM, la cual cuenta con 5 residuos de W en las posiciones 12, 75, 166, 177 y 200. En condiciones nativas el espectro de fluorescencia de la EhTIM mostró un λ_{\max} de 333 nm. Si este valor se compara con el que se obtiene en TbTIM (322 nm), existe una diferencia de 10 nm. Los autores

sugieren que este comportamiento se debe a la diferencia de accesibilidad entre el W90 de TbTIM y el W75 de EhTIM.

Actualmente se han realizado estudios de desnaturalización en GITIM monitoreados por fluorescencia intrínseca, demostrando que en condiciones desnaturalizantes la proteína presenta mayor intensidad de fluorescencia que en condiciones nativas (un aumento mayor al 100 %). En condiciones desnaturalizantes la longitud de onda de emisión se recorre a 357 nm, sugiriendo que los Triptófanos se encuentran expuestos al solvente. Al desdoblarse la proteína por el desnaturalizante, un W que podría estar apagado puede ahora emitir su fluorescencia debido a que el residuo que lo apagaba ahora se encontraría alejado. Por esta razón se propone que en GITIM uno o más Triptófanos encuentran apagados en condiciones nativas (presentando un fenómeno de “quenching”).

JUSTIFICACIÓN.

Debido a la existencia de cepas resistentes a metronidazol de *Giardia lamblia* y al problema salud pública que este parásito genera en los países en vías de desarrollo; el grupo de trabajo ha propuesto a la triosafosfato isomerasa como blanco para el diseño de un fármaco especie-específico.

En el caso de GITIM la fluorescencia intrínseca debida a sus triptófanos ayudará a comprender la función y estructura de ésta enzima cuando se le trate a diferentes condiciones o con diferentes compuestos que a futuro podrían ser de utilidad para el diseño de un fármaco especie-específico para tratar a la giardiasis.

HIPÓTESIS.

Al sustituirse los triptófanos por fenilalanina en GITIM, se podrá determinar la contribución a la fluorescencia intrínseca de cada uno, siempre y cuando no se afecte el medio que rodea a dichos triptófanos.

OBJETIVOS.

a) General:

Determinar la participación de cada uno de los cuatro residuos de W en las propiedades fluorescentes de GITIM.

b) Particular:

- ✓ Obtener cuatro mutantes sencillas sustituyendo un W por F: W75F, W162F, W173F y W196F. Esto a través de técnicas de mutagénesis dirigida por PCR.
- ✓ Sobreexpresar las distintas proteínas mutantes en un sistema bacteriano.
- ✓ Determinar las constantes cinéticas de las distintas proteínas mutantes mediante técnicas espectrofotométricas.
- ✓ Determinar los espectros de emisión de fluorescencia de las distintas proteínas mutantes.

METODOLOGÍA.

1. Purificación del ADN.

A partir de un cultivo de *Escherichia coli* de la cepa Top-10, se aisló el vector pET-3a que contenía el inserto del gen de GITIM. Para lo cual, se utilizó la clona 13* del gen de GITIM previamente generada en el Laboratorio de Bioquímica Genética^{21, 27}. La purificación del plásmido se realizó con un kit comercial (Rapid plasmid purification system). El método consiste en lisar las bacterias y extraer el ADN que se une a una columna de silica y se eluye con agua. Finalmente, para corroborar la purificación del plásmido, se prepararon geles de agarosa al 1 % (Ver Apéndice II).

2. Diseño de los oligonucleótidos mutagénicos.

Usualmente, los oligonucleótidos suelen tener un tamaño de 18 a 25 nucleótidos y por lo general, la pareja de oligonucleótidos utilizada en una amplificación debe tener una temperatura de alineamiento similar, con un máximo de 5°C de diferencia entre ellos. Es importante revisar los posibles sitios de complementariedad entre oligonucleótidos y el ADN molde (Ver Apéndice III).

Los oligonucleótidos mutagénicos para la generación de los genes mutantes se diseñaron a partir de la secuencia del gen de GITIM (774 pb. Fig. 7) que se muestra en la Figura 6²⁸. Dicha secuencia se obtuvo a partir del GeneBank con el número de acceso L02021.

1 **atg** cct gct cgt cgc ccc ttc atc ggc ggt aac ttc aag tgt aac ggc tct ctt gac ttt atc aag agc cac
73 gtg gcg gca att gct gcc cat aag atc cct gat tcc gtg gac gtc gtc att gcc cct tcc gcc gta cac ctg
145 tea aca gcc att gcg gca aac acg tca aaa cag ttg agg ata gca gcg cag aat gtg tac cta gag ggg
214 aac ggg ***gcg tgg act ggc gag aca*** agt gtt gag atg ctt cag gac atg ggt ttg aag cat gtg ata gta
283 ggg cac tct gaa aga cgc aga atc atg ggg gag acc gac gag caa agc gcc aag aag gct aag cgt gcc
352 ctg gaa aag ggg atg acg gtc atc ttc tgc gtc gga gag acc ttg gac gag cgc aag gcc aac cgc acc
421 atg gag gtg aac atc gcc cag ctt gag gcg ctt ggc aag gag ctc gga gag tcc aag ***atg ctc tgg aag***
490 ***gag gtt gtc*** att gct tac gag ccc ***gtg tgg tcc att ggc acg*** ggc gtg gtg gcc acg ccc gag cag gca
559 gag gag gtc cat gtg ggg ctc ***cga aag tgg ttt gcg gag aag*** gtt tgt gcc gag ggc gca cag cat atc
628 cgt atc att tac ggg gga tgc gcc aat gga agc aac tgc gag aag ctt ggc cag tgt ccg aat att gac ggc
700 ttc ctt gtc ggt ggc gct tcc ctc aag ccg gag ttt atg acg atg atc gac att ctt acg aag acc cgt aca
772 **tag**

Figura 7. Secuencia de GITIM. En negritas se muestran: el codón de inicio (**atg**), los aminoácidos tomados en cuenta para el diseño de los oligonucleótidos de cada W y el codón de término (**tag**). En letras itálicas y subrayadas, se muestran los tripletes para W (**tgg**) de cada una de las 4 posiciones.

En la Tabla 3 se muestran las características de los oligonucleótidos mutagénicos.

Tabla 3. Características de oligonucleótidos para cada mutante.

<i>Mutante.</i>	<i>Tamaño del oligonucleótido (pb).</i>	<i>Temperatura de alineamiento (°C).</i>	<i>Secuencia de oligonucleótidos 5' --- 3' Forward (Fw).</i>	<i>Secuencia de oligonucleótidos 5' --- 3' Reverse (Rv).</i>
<i>W75F</i>	19	53	<i>ggcg</i> <u><i>ttt</i></u> <i>actggcgagaca</i>	<i>tgtctcgccagtaaacgcc</i>
<i>W162F</i>	20	53	<i>tgctct</i> <u><i>ttt</i></u> <i>aaggaggtgtc</i>	<i>gacaacctctt</i> <u><i>aaa</i></u> <i>gagca</i>
<i>W173F</i>	19	53	<i>cgtg</i> <u><i>ttt</i></u> <i>ccattggcacg</i>	<i>cgtgccaatg</i> <u><i>gaaaa</i></u> <i>cacg</i>
<i>W196F</i>	21	55	<i>cgaaag</i> <u><i>ttttt</i></u> <i>gcgcagaag</i>	<i>cttctgcg</i> <u><i>caaaaa</i></u> <i>actttcg</i>

3. Mutagénesis dirigida por PCR.

3.1 Breve descripción:

Los diferentes genes mutantes se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida por PCR (Ver Apéndice III) con el método de solapamiento y extensión ¹⁴ a partir del gen de GITIM. Con este método en la primera reacción (PCR-1) se amplificó la parte del gen, flanqueada por el oligonucleótido directo externo (T7 Promoter) y el oligonucleótido mutagénico reverso (Fig. 8). En el PCR-2 se amplificó el extremo contrario del gen con un

oligonucleótido reverso externo (T7 Terminator) y el oligonucleótido mutagénico directo. En el PCR-3 se combinaron los productos del PCR-1 y PCR-2 ya que estos son exactamente complementarios en uno de sus extremos; además se utilizaron los oligonucleótidos directo y reverso externos ⁹ (Fig. 8).

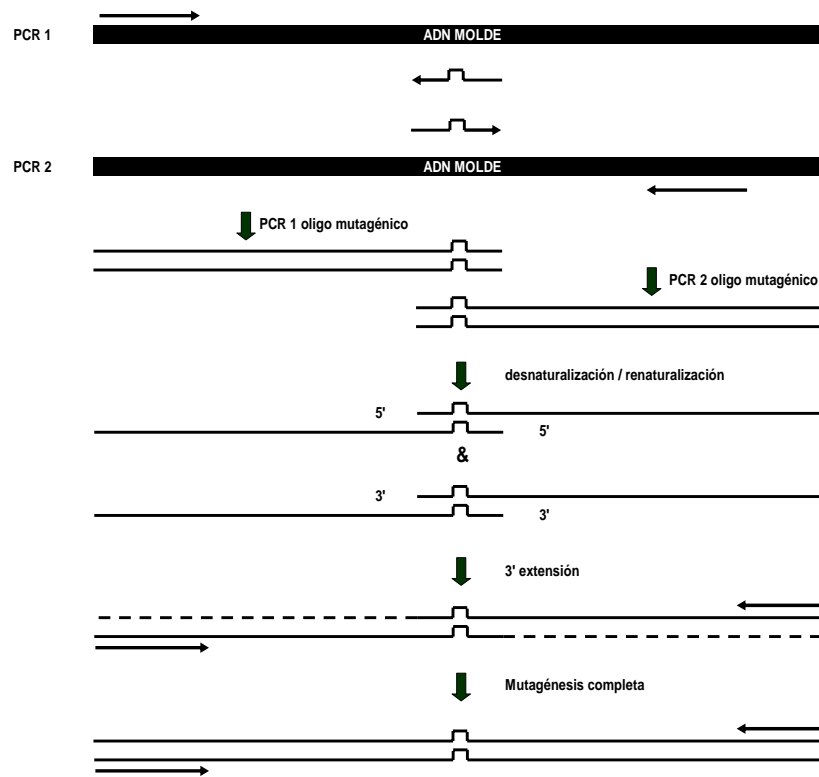


Figura 8. Esquema de cómo se lleva a cabo la mutagénesis dirigida por PCR ¹⁰.

3.2 Condiciones experimentales:

Las concentraciones que se emplearon para llevar a cabo las reacciones de PCR fueron las siguientes: dNTP's 0.2 mM, T7 Promoter y T7 Terminator 200 ng, oligonucleótidos mutagénicos Rv y Fw (dependiendo de cada mutante: W75F, W162F, W173F y W196F) 200 ng, ADN de GITIM (Clona 13) 100 ng (para el caso del último PCR, se agregan 200 ng de los productos de PCR-1 y PCR-2), amortiguador MgSO₄ 1.5 mM, amortiguador High fidelity 10X (que contiene tris-SO₄ 600 mM, pH = 8.9, sulfato de amonio 180 mM) y Taq polimerasa 2.5 U.

Una vez obtenido el amplificado del producto del último PCR, se realizaron digestiones con las enzimas de restricción BamHI y NdeI para la inserción del gen mutado en el vector pET-3a.

4. Restricciones.

Las condiciones para llevar a cabo las digestiones fueron: 1 µg del producto del PCR-3, 1 µg del vector pET-3a, la enzima BamHI 10 U, la enzima NdeI 10 U y el amortiguador 2 1X (Contiene Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, ditiotreitól 1 mM, pH = 7.9, BSA 100 µg/mL). Estas condiciones se emplearon con reactivos marca New England Biolabs. Las digestiones se realizaron en el horno de microondas por 6 ciclos y cada ciclo consta de calentar las muestras durante 20 segundos y posteriormente permitir un receso de 2 minutos. Una vez terminados dichos ciclos, se corrió un gel de agarosa al 1 % (Ver Apéndice II); las bandas digeridas se aislaron y purificaron de la agarosa para posteriormente realizar la ligación.

5. Ligación.

Las condiciones para las ligaciones fueron: T4ADN ligasa 1 U, amortiguador 1X (Contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól 10 mM, ATP 1 mM, BSA 25 µg/mL), pET-3a digerido (Con las enzimas de restricción BamHI y NdeI) y el producto del PCR-3. La proporción que se agregó de pET-3a y del PCR-3 es de 1 a 3, respectivamente. La mezcla se incubó durante 12 hrs a 16°C.

6. Obtención del vector pET-3a.

El gen de TcTIM se encuentra clonado en los sitios NdeI y BamHI en el vector pET-3a. Se realizaron digestiones con las enzimas NdeI-BamHI para obtener únicamente al vector pET-3a. El inserto de TcTIM se desechó y se empleó el vector pET-3a.

Después de aislar el vector pET-3a, se realizó la subclonación (ligación) del inserto de las diferentes mutantes en dicho vector, utilizando las condiciones que se indican en el punto número 5 de la metodología.

7. Transformación en bacterias *E. coli* de la cepa TOP-10.

El producto de la clonación se incorporó en bacterias competentes *E. coli* de la cepa TOP-10 (Ver Apéndice VI). Se mezclaron el producto de la ligación con las bacterias competentes, se incubaron en hielo durante 30 minutos y se expusieron a un choque térmico, incubando a temperatura ambiente durante 3 minutos. Las bacterias posteriormente se resuspendieron en medio líquido LB sin ampicilina y se incubaron durante 30 minutos a 37°C con agitación constante. Las bacterias se centrifugaron a 12000 rpm y el botón se resuspendió nuevamente en medio líquido LB sin ampicilina. Las bacterias se sembraron en medio de cultivo sólido LB con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C durante 12 horas.

8. Secuenciación.

A todas las colonias aisladas se les extrajo el ADN plasmídico y después se realizó un análisis de restricción con la enzima HindIII. Esto con la finalidad de seleccionar la colonia con el gen de GITIM y no con el de TcTIM. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 1% (Ver Apéndice II). Como controles, se utilizaron los genes silvestres de TcTIM (Negativo) y GITIM (Positivo). Con esto se confirmó la clonación del gen con el tamaño correspondiente al del control positivo.

Después de confirmar la presencia del gen de GITIM, se secuenciaron mediante métodos automáticos.

9. Transformación de bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3)pLysS para sobreexpresión.

Una vez que se verificó que las secuencias de ADN fueran las adecuadas para cada mutación, estas se sobreexpresaron en bacterias competentes BL21(DE3)pLysS. La transformación se realizó como ya se indicó anteriormente (Ver apéndice IV).

10. Sobreexpresión.

10.1 Promotor T7:

El vector pET-3a tiene una región de expresión controlada por el promotor T7. Para inducir la expresión del gen de la TIM de cualquiera de las mutantes, se agregó Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM, que induce la transcripción por la T7 ARN polimerasa. La T7 ARN polimerasa se une a este promotor e inicia la transcripción del gen. Este promotor puede inducirse selectivamente para asegurar que aproximadamente un 50 % de la producción de proteínas corresponda a la recombinante.

10.2 Condiciones de sobreexpresión:

Para llevar a cabo la sobreexpresión de las proteínas de GITIM silvestre y las distintas mutantes de W (W75F, W162F, W173F y W196F) se probaron dos temperaturas durante la inducción, 30°C y 37°C, en cultivos de 7 mL, para después escalar la técnica. Lo anterior con la finalidad de encontrar la temperatura adecuada de sobreexpresión de las proteínas. El siguiente diagrama describe el procedimiento empleado.

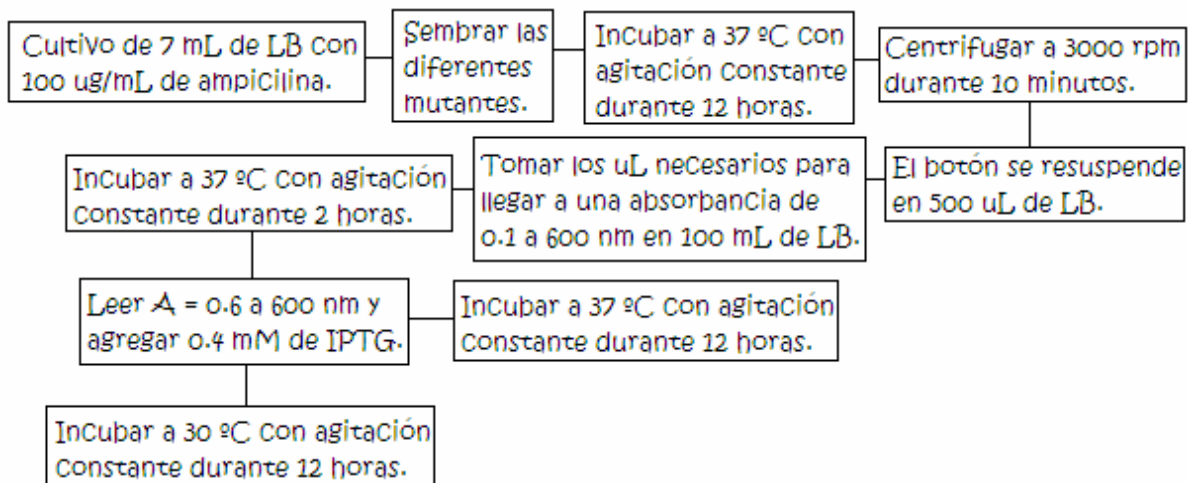


Figura 9. Diagrama de flujo del procedimiento que se llevó a cabo para realizar la sobreexpresión.

11. Purificación.

11.1 Purificación parcial.

Se realizaron ensayos de purificación en cultivos de 100 mL para observar si las enzimas mutantes de GITIM tenían actividad. Los cultivos con medio LB utilizados en la sobreexpresión de GITIM silvestre y las distintas mutantes (W75F, W162F, W173F y W196F), se centrifugaron a 3000 rpm y el botón se resuspendió en 5 mL de PBS 1X (este contenía PMSF 2 mM disuelto en DMSO al 1 %). Las bacterias se rompieron por sonicación durante 4 ciclos (cada ciclo fue de 40 segundos de sonicación con 2 minutos de descanso). Las mutantes se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante. La purificación final de las enzimas se realizó utilizando el método descrito en López-Velázquez y col, (2004). A partir de 500 mL de medio de cultivo.

12. Cuantificación de proteína.

El proceso de purificación de la proteína fue seguido por el método de BCA (Ácido Bicinconónico; ver Apéndice V). Para determinar la concentración de las proteínas puras se utilizó la absorbancia del UV a 280 nm y fueron calculadas con la ley de Beer-Lambert y el cálculo de ϵ_{280} . Este último se calculó de acuerdo a Pace y col (1995). Para GITIM se determinó una $\epsilon_{280\text{nm}} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) = 26470$; y para las mutantes = 20970.

13. Cinética.

La actividad catalítica de las proteínas se determinó en dirección de GAP a DHAP. Mediante métodos espectrofotométricos, siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm causada por la oxidación del NADH en un ensayo acoplado con la enzima α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (α -GDH) a 25°C ¹¹.

Las actividades de todas las mutantes de GITIM se midieron a pH de 7.4 a 25°C en una mezcla de reacción que contenía trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, GAP 1 mM, NADH 0.2 mM y α - glicerol fosfato deshidrogenada 0.9 unidades. La reacción se inició con la adición de 5 ng de proteína por mL. El decaimiento en la absorbancia de la reacción a 340 nm se siguió con ayuda de un espectrofotómetro Cary 100. Para determinar los

parámetros cinéticos se utilizaron las condiciones anteriormente mencionadas, excepto que la concentración de sustrato varió entre 0.4 a 3 mM.

14. Fluorescencia intrínseca.

Los espectros de emisión de fluorescencia (Ver apéndice I) se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5000U. Se utilizaron 100 µg/mL de proteína en todos los casos. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm. El paso de la luz fue de 1.5 nm y 15 nm para los slits de excitación y emisión, respectivamente. El espectro de emisión se cuantificó de 310 a 500 nm a 25°C. Se utilizó una celda de cuarzo con un paso de luz de 1 cm. Cada espectro obtenido fue el resultado del promedio de 5 repeticiones. Se utilizó como blanco el amortiguador de TE pH 7.4 (trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM,), mismo que se empleó para las diluciones de las proteínas. La emisión máxima de fluorescencia en nm (λ_{max}) se calculó seleccionando el punto que exhibía la intensidad más alta.

RESULTADOS.

i. Obtención de genes mutantes.

Para obtener los genes mutantes W75F, W162F, W173F y W196F, de la clona 13* de GITIM se purificó el ADN, cuyo peso estimado es de 5374 pb (4600 pb del pET-3a + 774 pb del gen. Fig. 10).

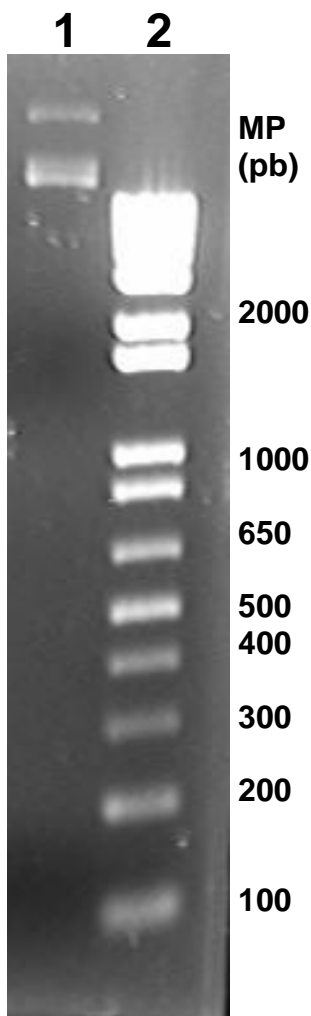


Figura 10. Gel de agarosa al 1% donde, en el carril 1 se observa la muestra extraída del ADN plasmídico y en el carril 2, el marcador de peso molecular (MP).

A partir de este ADN se amplificaron los diferentes productos de PCR para cada mutante. La Tabla 4 muestra el peso esperado (pb) para cada producto de PCR. La Figura 11 muestra los geles de agarosa, donde se observa el peso obtenido para cada producto de PCR. Estos amplificados se digirieron con las enzimas NdeI-BamHI para su posterior

inserción en el vector pET-3a. Como se muestra en la figura 12, al momento de la digestión se eliminan 147 pb que permiten corroborar dicha digestión.

Tabla 4. Tamaño de los productos de amplificación de los diferentes PCR's de la mutagénesis.

<i>Mutante.</i>	<i>Tamaño del producto del PCR-1 (pb).</i>	<i>Tamaño del producto del PCR-2 (pb).</i>	<i>Tamaño del producto del PCR-3 (pb). *</i>
<i>W75F</i>	<i>316</i>	<i>624</i>	<i>921</i>
<i>W162F</i>	<i>577</i>	<i>364</i>	<i>921</i>
<i>W173F</i>	<i>610</i>	<i>330</i>	<i>921</i>
<i>W196F</i>	<i>679</i>	<i>263</i>	<i>921</i>

* Tomando en cuenta que del T7Promoted al codón de inicio (ATG) del gen, son 79 pb y del codón de termino (TAG) al T7Terminator, son 68 pb.

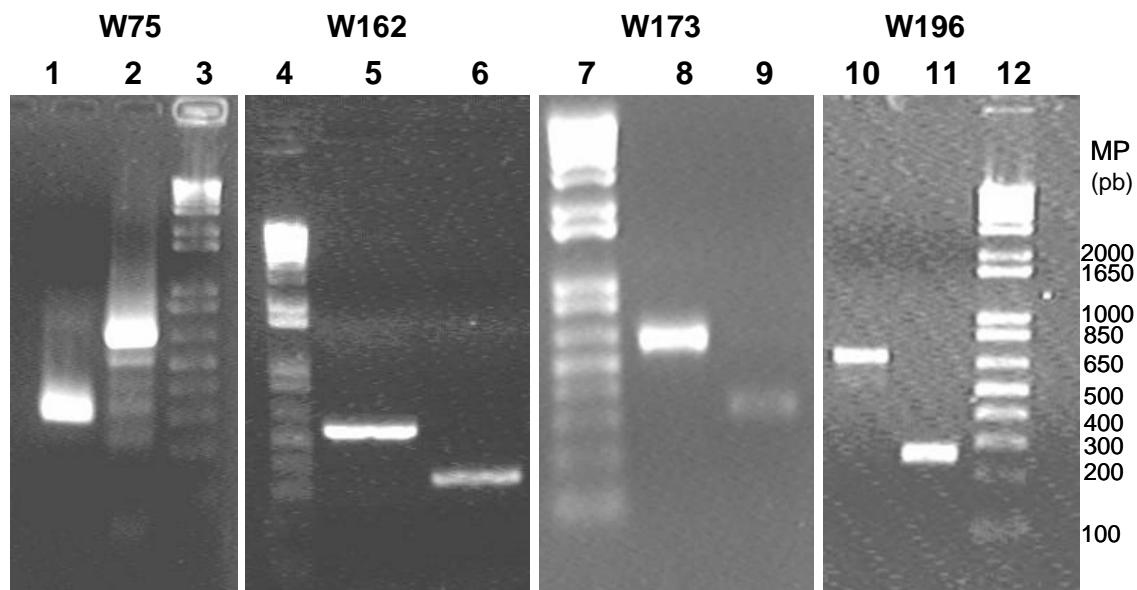


Figura 11. Geles de agarosa al 1% donde se observan en el carril 1, el producto del PCR-1 de la mutante W75F; en el carril 2, el producto del PCR-2 de la mutante W75F; en el carril 3, MP de 1 kb plus de invitrogen; en el carril 4, MP; en el carril 5, el producto del PCR-1 de la mutante W162; en el carril 6, el producto de PCR-2 de la mutante W162; en el carril 7, MP; en el carril 8, el producto del PCR-1 de la mutante W173F; en el carril 9, el producto del PCR-2 de la mutante W173F; en el carril 10, el producto del PCR-1 de la mutante W196; en el carril 11, el producto del PCR-2 de la mutante W196 y en el carril 12, MP.

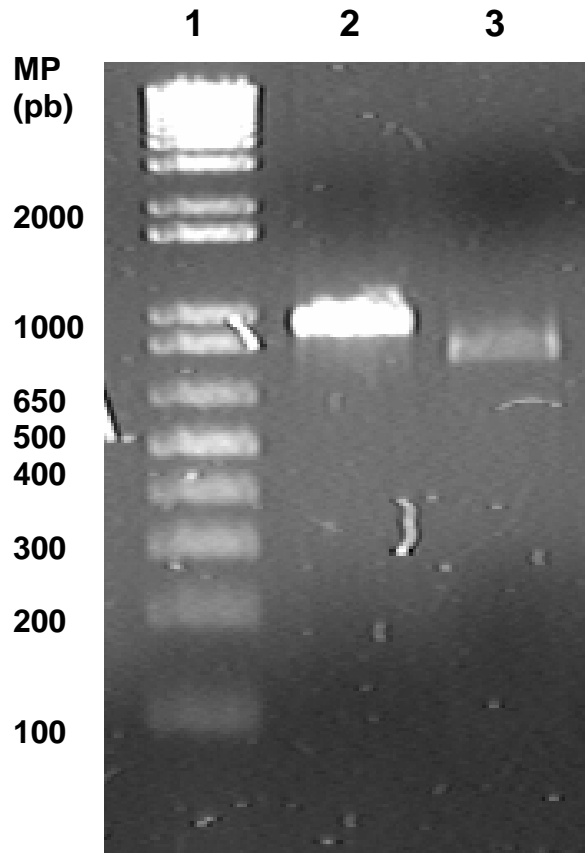


Figura 12. Ejemplo de un producto de PCR 3 donde se muestra en el carril 1, MP; carril 2, PCR3 sin digerir (921 pb) y carril 3, PCR3 digerido (774 pb) con NdeI-BamHI.

Una vez obtenidas las distintas mutantes, se transformaron en *E. coli*, cepa Top-10. Como colonia positiva se seleccionó aquella que después de digerir su ADN con la enzima de restricción Hind III mostró un patrón de digestión igual al de GITIM. Esto se realizó debido a que se partió de pET-3a que contenía clonado el gen de TcTIM (previamente digerido con NdeI-BamHI). HindIII digiere tanto en TcTIM como en GITIM pero en distintas posiciones, de tal forma que se obtienen fragmentos con diferentes tamaños, lo que permitió diferenciarlos. Esta estrategia se utilizó para aumentar la eficiencia de clonación, en la Figura 13 se muestra un ejemplo de digestión con Hind III donde se obtienen tanto ADN de TcTIM como GITIM. La colonia seleccionada como positiva se le extrajo ADN y se secuenció para corroborar la mutación y asegurar que no existían errores en la secuencia.

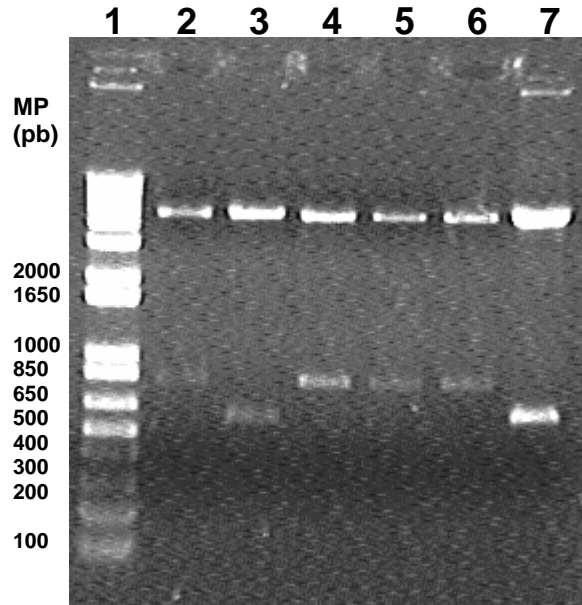


Figura 13. Gel de agarosa al 1% donde se observa en el carril 1, MP; carril 2, el control negativo (ADN de TcTIM); carril 3, el control positivo (ADN de GITIM); carril 4, muestra de la clona A, carril 5, muestra de la clona B; carril 6, muestra de la clona C y carril 7, muestra de la clona D (positiva).

ii. Sobreexpresión de GITIM y las mutantes W75F, W162F, W173F y W196F.

La Figura 14 muestra los extractos de bacterias recombinantes corridas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE. Apéndice VI). Se probaron 30 y 37°C como temperaturas de inducción para la sobreexpresión. Tanto las enzimas de GITIM silvestre como las mutantes se sobreexpresaron en ambas temperaturas. Sin embargo, los resultados muestran que las distintas mutaciones no afectan la sobreexpresión de la proteína. Finalmente se eligió la inducción a 30°C ya que GITIM silvestre se sobreexpresó mejor a 30°C y así al hacer las comparaciones con las diferentes mutantes, se eliminaría esta variable.

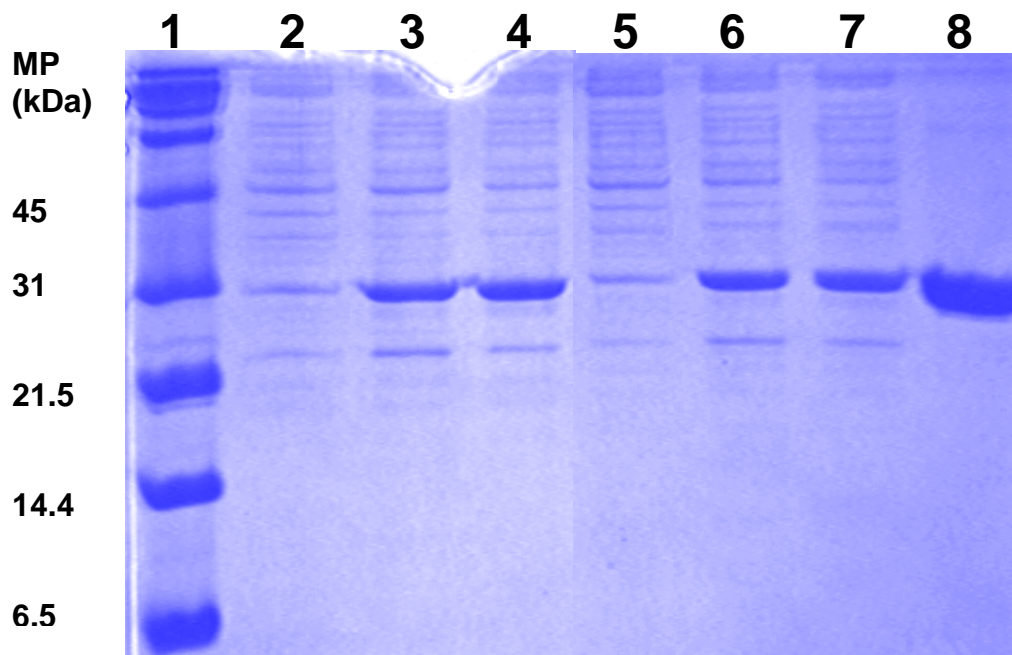


Figura 14. Gel SDS-PAGE donde se observa en el carril 1; MP; carril 2, bacterias de GITIM (silvestre) sin inducir; carril 3, bacterias inducidas a 30°C; carril 4, bacterias inducidas a 37°C; carril 5; bacterias de W162F sin inducir; carril 6, bacterias inducidas a 30°C; carril 7, bacterias inducidas a 37°C y finalmente en el carril 8, muestra purificada de GITIM (Control Positivo).

iii. Purificación.

Una vez sobreexpresadas las distintas proteínas, se purificaron de acuerdo al protocolo previamente descrito por López-Velázquez y cols. 2004.

La figura 15 muestra que las proteínas tienen una pureza mayor al 95 %, lográndose obtener entre 15 y 20 mg de proteína total para las distintas enzimas.

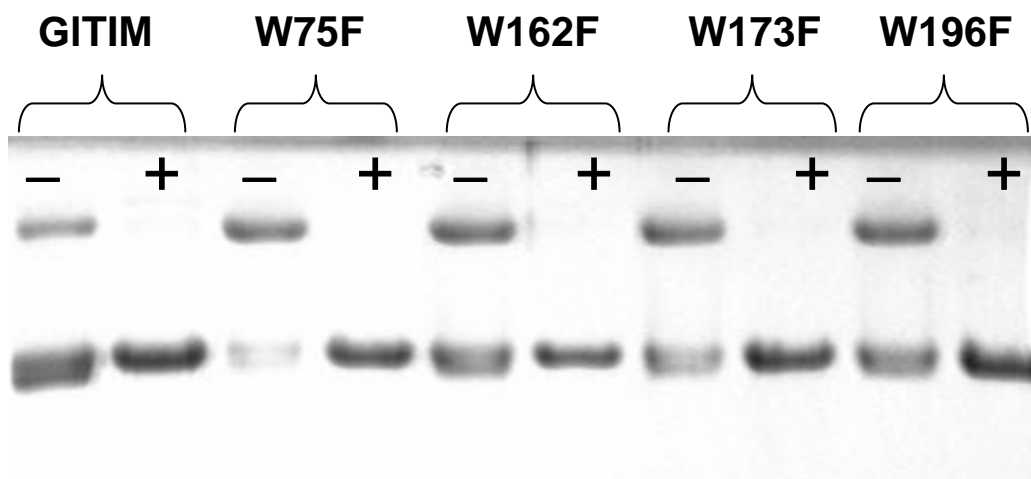


Figura 15. Gel de poliacrilamida donde se comparan las diferentes proteínas mutantes purificadas contra la proteína silvestre. (-) Ausencia de agente reductor (DTT) y (+) presencia de agente reductor.

iv. Cinética.

Para evaluar la integridad del sitio catalítico de las distintas proteínas mutantes se determinaron sus constantes cinéticas.

Tabla 5. Parámetros cinéticos.

<i>Proteína.</i>	K_m (mM).	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).	k_{cat} (min^{-1}) $\times 10^5$.	k_{cat}/K_m (mM^{-1}) $\text{min}^{-1} \times 10^5$.
<i>GITIM silvestre.</i>	0.33 ± 0.03	4216 ± 119	2.3 ± 0.06	6.97
<i>W75F</i>	0.74 ± 0.6	8825 ± 236	4.9 ± 0.13	6.62
<i>W162F</i>	0.28 ± 0.03	3713 ± 118.46	2.06 ± 0.06	7.36
<i>W173F</i>	0.94 ± 0.19	6656 ± 576	3.7 ± 0.3	3.94
<i>W196F</i>	0.43 ± 0.05	4647 ± 174	2.6 ± 0.1	6.05

Como se muestra en la Tabla 5, la K_m de las mutantes W162 y W196F, son similares a la silvestre; no así para las mutantes W75F y W173F que presentan menor afinidad por su sustrato. Los valores de V_{max} para estas dos últimas mutantes, aumentan. Por otra parte, los valores de eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de las mutantes W75F y W196F fueron 1.8 y 1.1 veces menor, respectivamente comparados con el valor de la silvestre. Este resultado

sugiere que la sustitución de tales residuos en dichas posiciones afectó la eficiencia en la catálisis de estas mutantes (Ver en discusión).

v. **Evaluación de la fluorescencia intrínseca.**

La Figura 16 muestra los espectros de fluorescencia de las mutantes de GITIM.

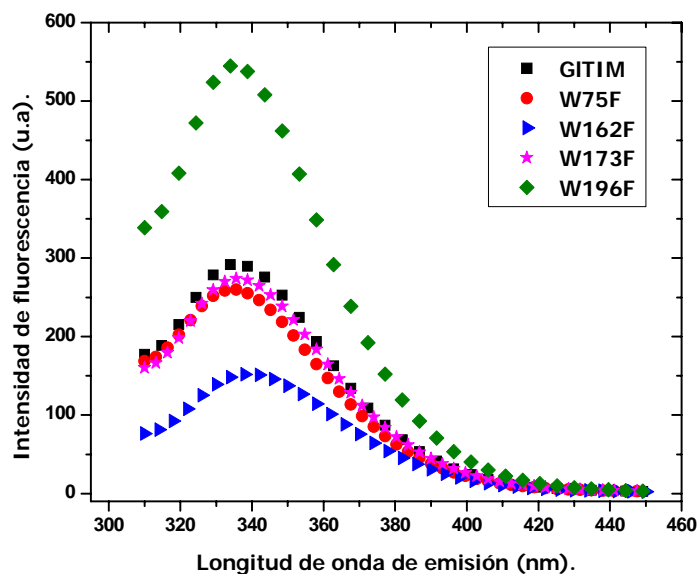


Figura 16. Espectros de fluorescencia intrínseca de la proteína GITIM y las diferentes mutantes, con una longitud de onda de excitación de 295 nm.

De acuerdo a los resultados anteriores, se calculó la longitud de onda de máxima emisión (λ_{max}), la intensidad de fluorescencia (IF) y el porcentaje de la IF (%IF) considerando el 100 % a GITIM (Tabla 6).

Tabla 6. Datos de Fluorescencia intrínseca.

	λ_{max} (nm).	IF (u.a).	%IF (%)
<i>GITIM</i>	<i>335</i>	<i>292</i>	<i>100</i>
<i>W75F</i>	<i>334</i>	<i>260</i>	<i>89</i>
<i>W162F</i>	<i>339</i>	<i>152</i>	<i>52</i>
<i>W173F</i>	<i>336</i>	<i>274</i>	<i>94</i>
<i>W196F</i>	<i>335</i>	<i>546</i>	<i>187</i>

DISCUSIÓN.

La construcción de las mutantes de triptófano (W75F, W162F, W173F y W196F) para la GITIM proporcionó un estimado de la contribución de cada uno de los triptófanos en la fluorescencia intrínseca de la enzima. Debido a la gran sensibilidad y a la baja probabilidad de error, la técnica de mutagénesis dirigida fue de gran ayuda para la obtención de las mutantes. Al secuenciar el ADN de las clonas que consideramos positivas se confirmó la presencia tanto del gen de GITIM, como de las mutantes en la posición correcta.

Al purificar todas las proteínas, se observó la existencia de las especies diméricas y tetraméricas. Con ayuda de técnicas cromatográficas se aisló con facilidad la especie dimérica para trabajar con ella. El empleo de muestras libres de multímeros es de relevancia para este trabajo debido a que la formación del tetrámero genera una nueva interfase entre los dímeros, de la cual se desconoce por completo sus propiedades. Por tanto, no es posible predecir su efecto sobre las características de la fluorescencia intrínseca de los Triptófanos. Para eliminar la contribución de la variable anteriormente mencionada, se eligió trabajar con la especie dimérica. Más aún, debido a que la mayoría de los análisis de fluorescencia realizados en la TIM de otras especies han sido con homodímeros, el estudio de la forma dimérica de GITIM nos permite comparar con tales antecedentes. Además de descartar la especie tetramérica, fue necesario evaluar si las proteínas colectadas presentaban actividad de TIM y para ello se empleó la reacción que lleva a cabo dicha enzima en dirección de GAP a DHAP. Es importante mencionar que durante todo el proceso de purificación se tomaron alícuotas para cuantificar proteína, de modo que cada una de las alícuotas fungió como controles del proceso. Esto es, las alícuotas que se tomaron se separaron en un gel de SDS-PAGE y se compararon con un control positivo para estar seguros de que la proteína de interés se encontraba en cada paso y así continuar con los siguientes experimentos. Aunado a esto, se realizaron ensayos de actividad con cada una de las alícuotas y determinar que las enzimas no se inactivaran durante el proceso de purificación. Después de que las proteínas mutantes se purificaron con una pureza mayor al 95 %, se les determinaron sus parámetros cinéticos.

Las mutantes W75F y W173F presentaron cambios en estos parámetros con respecto a la silvestre (Tabla 5). Estas mutantes presentan menor afinidad por su sustrato, relacionado como un incremento en su K_m , pero su velocidad de catálisis (k_{cat}) aumenta de tal forma que su eficiencia catalítica no se modificó (k_{cat}/K_m). Recordemos que el W75 se encuentra en el asa 3 o asa de interfase (residuos 64 a 80). Un aumento en la K_m de la mutante W75F posiblemente implicaría que se modificó el acomodamiento de esta asa al realizarse dicha sustitución. El asa 3 participa en la formación del dímero; es decir, el asa 3 de una subunidad forma uniones de van der Waals con las asas 1 (residuos 13 a 17) y 4 (residuos 95 a 96) de la otra subunidad³⁸. Además, se forman puentes salinos entre la lisina 13 (residuo catalítico) y al ácido glutámico 98 de la misma subunidad. Cabe mencionar que el ácido glutámico 98 forma también un puente de hidrógeno con la treonina 76 de la otra subunidad³⁷. La treonina 76 forma parte de la secuencia TGE, la cual es muy conservada (Figura 17). Si sustituimos al W75 por una F, es posible que el puente de hidrógeno entre la treonina 76 y el ácido glutámico 98, se vea afectado y por tanto la lisina 13 (con quien forma un puente salino) no se acomode adecuadamente. Por tanto, la especificidad por el sustrato podría disminuir. De modo similar podemos observar que el W173 que se encuentra en el asa 6 o asa catalítica (residuos 173 a 182) podría estar modificada tridimensionalmente a causa de la mutación. Se sabe que el grupo NH de una G176 que se encuentra dentro del asa 6, forma un puente de hidrógeno con el grupo fosfato del sustrato y esta integración asegura la transformación del sustrato⁴⁸. Es así que sustituir al W173 por una F, podría impedir la formación del puente de hidrógeno de la G176 con el grupo fosfato del sustrato. Otros estudios relacionados con el movimiento del asa 6 en su región amino terminal han demostrado que estabiliza la unión del sustrato. De hecho esta región amino terminal es altamente conservada de modo que modificaciones en ella pueden producir cambios en la catálisis de la enzima⁴⁸.

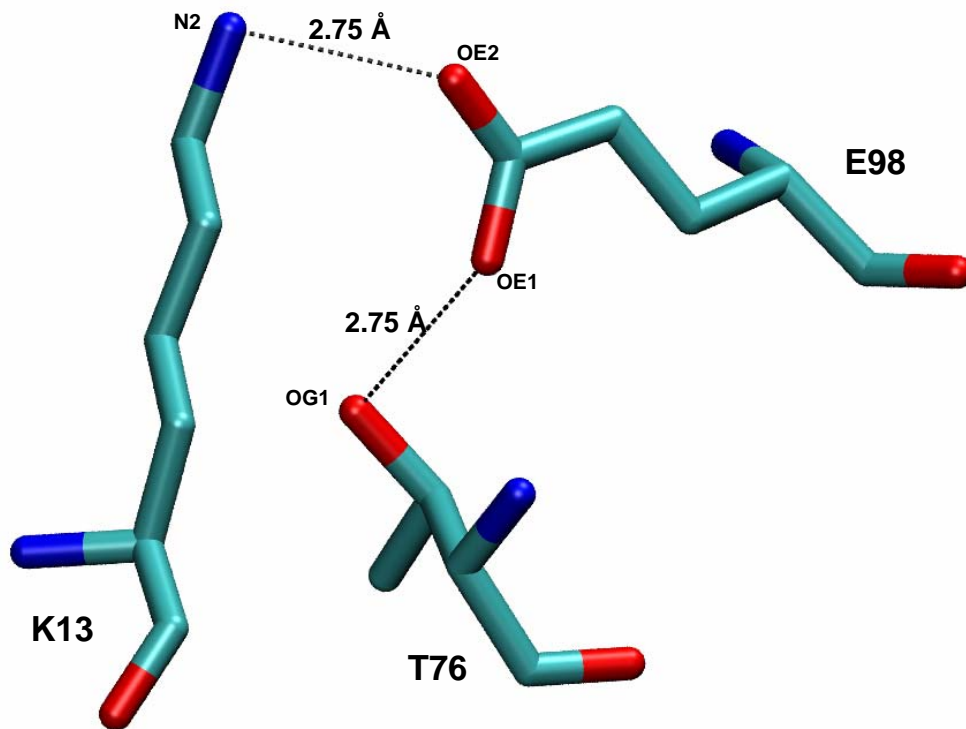


Figura 17. Acercamiento en la región de la interfase donde se localiza el W75 adyacente a la T76. El O γ de la T76 de una subunidad, se encuentra a distancia de puente de hidrógeno con el O ϵ 1 del E98 de la otra subunidad. Por otra parte, el O ϵ 2 del E98 se encuentra a distancia de puente salino con el N2 K13 (residuo catalítico) de la misma subunidad.

Para los parámetros cinéticos obtenidos en TbtTIM⁵ y PftTIM³² se observaron diferencias entre los valores de las mutantes y sus respectivas enzimas silvestres (Tabla 2). Sin embargo, al realizar estudios de dicroísmo circular, se encontró que todas las mutantes de TbtTIM y PftTIM tenían una estructura secundaria muy similar a la silvestre (Ver Fig 1 de Cháñez-Cárdenas y cols, 2002 y Fig. 2 de Pattanaik y cols, 2003; respectivamente). Con estos datos concluyen que a pesar de existir diferencias en los parámetros cinéticos éstos no modifican los resultados obtenidos del análisis de la fluorescencia intrínseca.

Para el caso de GitTIM, las diferencias existentes entre los valores de los parámetros cinéticos entre GitTIM silvestre y sus diferentes mutantes (Tabla 5), son similares a las encontradas para TbtTIM y PftTIM^{5, 32} respectivamente. Por lo tanto se concluye que los

resultados de dichos parámetros cinéticos se pueden tomar como válidos para realizar las determinaciones de la fluorescencia intrínseca.

Para determinar la contribución de cada uno de los 4 residuos de W en las propiedades fluorescentes de GITIM se realizaron experimentos de emisión de fluorescencia, excitando a 295 nm. De los resultados (Fig. 16 y Tabla 6), se discute lo siguiente:

Los valores de λ_{\max} calculados para la silvestre y para las diferentes mutantes, fueron similares entre sí; excepto la mutante W162F ($\lambda_{\max} = 339$ nm. Fig. 16) que presenta un corrimiento hacia el rojo en el espectro de emisión de 4 nm. Esto sugiere un cambio en el ambiente cercano en cualquiera de los tres Triptófanos restantes.

► Mutante W75F:

Se calculó el porcentaje de la intensidad de fluorescencia (%IF) para tener un estimado de cuánto contribuye cada W a la fluorescencia intrínseca de la enzima. Se observó que el W75 no contribuyó significativamente a la fluorescencia intrínseca de la proteína, puesto que la mutante W75F presentó un %IF muy cercano al de la silvestre (89 %. Tabla 6).

► Mutante W162F:

En la mutante W162F se observó un comportamiento diferente a las otras mutantes puesto que presentó un %IF de la mitad que la silvestre (52 %. Tabla 6), lo que significa que el W162 contribuye con la mitad de la fluorescencia intrínseca de la enzima (Fig. 16).

► Mutante W173F:

Esta mutante no contribuye significativamente a la fluorescencia intrínseca de la enzima (Tabla 6). Por otro lado, los estudios de Pattanaik y cols (2003) sobre la PfTIM, muestran que el W168, que es equivalente en posición al W173 de GITIM (Fig 5), presentó una disminución en la IF de un 30 %. Por lo que este caso fue contrario en GITIM, el cual presentó un %IF muy cercano a la silvestre. Es importante recordar que PfTIM presenta solo 2 Triptófanos y el que contribuye con el 70 % de su fluorescencia es el W11.

► Mutante W196F:

Esta mutante presenta un %IF de casi el doble que la silvestre (187 %. Tabla 6). Esto implica que alguno de los tres Triptófanos que aún presenta esta mutante (W175, W162 y W173) fluoresce con mayor intensidad, pero que el W196 está apagando su fluorescencia. Para evidenciar cuál residuo es el que fluoresce con esta intensidad, se calcularon las distancias entre el C η_2 del W196 y el C η_2 de cada uno de los Triptófanos con ayuda de las coordenadas cristalográficas de GITIM (Figura 18). Se encontró que la distancia que existe entre el W196 - W75 es de 27.2 Å, W196 - W173 21.8 Å y W196 - W162 4.2 Å. Este último W se encuentra más cerca del W196, lo que sugiere que el W162 es el que emite el aumento de la intensidad de fluorescencia cuando el W196 no se encuentra apagándolo (Ver apéndice I). Como ya se mencionó en los antecedentes, se encontró que en condiciones desnaturalizantes la intensidad de fluorescencia de GITIM aumenta, esto puede deberse al apagamiento del W162.

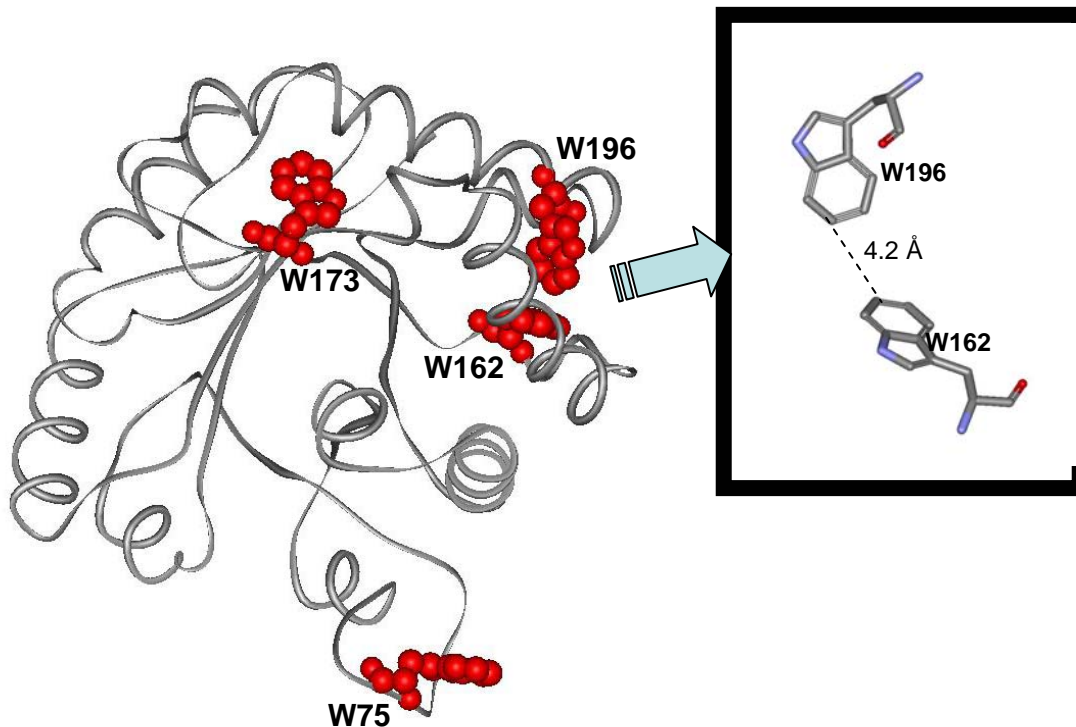


Figura 18. Monómero de GITIM donde se exhiben los residuos de triptófano con un acercamiento del W196 y el W162. Estos últimos forman la pareja de triptófanos con la menor distancia entre ellos

Por otro lado, Ch3nez-C3rdenas y cols (2002) observaron que el W159 present3 una fluorescencia intr3nseca igual a la TbTIM. Ellos sugieren que la TbTIM presenta un fen3meno de “quenching” o apagamiento del W193 sobre el W159. Este fen3meno de apagamiento se le conoce como apagamiento colisional y ocurre cuando el estado excitado del fluor3foro es desactivado por el contacto con alguna otra mol3cula en soluci3n. A esta otra mol3cula se le denomina apagador o “quencher”. En este caso, la fluorescencia regresa al estado estacionario durante el choque difusivo con el apagador. Cabe mencionar que las mol3culas no son alteradas en el proceso (Ap3ndice I). Si se comparan los resultados que se obtuvieron en este trabajo y los de Ch3nez-C3rdenas y cols, (2002) se aprecian similitudes interesantes. El W159 y el W193 de TbTIM son equivalentes al W162 y al W196 de GITIM, respectivamente (Fig. 5). Lo anterior sugiere que el fen3meno de apagamiento ocurre en ambas enzimas aunque sean de diferentes microorganismos. Sin embargo, en TbTIM no se logr3 demostrar el fen3meno de apagamiento, debido a que no pudieron obtener la mutante W193F.

CONCLUSIONES.

- ⊕ Los triptófanos 75 y 173, aparentemente, no contribuyen significativamente a la fluorescencia intrínseca de GITIM.
- ⊕ El W162 contribuye en un 50 % en la fluorescencia intrínseca de GITIM.
- ⊕ El W196 podría presentar un fenómeno de apagamiento sobre el W162.

PERSPECTIVAS.

Para confirmar si efectivamente ocurre un fenómeno de apagamiento del W196 sobre el W162 en GITIM, es necesario obtener enzimas mutantes que tengan un solo W (mutantes triples). Esto permitirá tener más clara la contribución de cada uno de los residuos de W en la fluorescencia intrínseca de la enzima.

Tanto las mutantes sencillas y triples nos permitirán a futuro realizar estudios de plegamiento y desplegamiento en GITIM. También nos ayudará a determinar los cambios en la estructura terciaria de GITIM que se produzcan por distintos compuestos inactivadores.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Alvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., Wierenga, R. K. and Maes, D., 1998, Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties, *J Biol Chem.*, 273:2199-206.
- 2) Aparicio, R., Ferreira, S. T. and Polikarpov, I., 2003, Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: evidence of conformational heterogeneity, *J Mol Biol.*, 334:1023-41.
- 3) Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D. and Waley, S. G., 1975, Structure of chicken muscle triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data, *Nature*, 255:609-14.
- 4) Bell, G. S., Russell, R. J., Kohlhoff, M., Hensel, R., Danson, M. J., Hough, D. W. and Taylor, G. L., 1998, Preliminary crystallographic studies of triosephosphate isomerase (TIM) from the *hyperthermophilic Archaeon Pyrococcus woesei*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 54:1419-21.
- 5) Cháñez-Cárdenas, M. E., Fernández-Velasco, D. A., Vázquez-Contreras, E., Coria, R., Saab-Rincón, G. y Pérez-Montfort, R., 2002, Unfolding of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of intermediates and insight into the denaturation pathway using tryptophan mutants, *Arch Biochem Biophys*, 399:117-129.
- 6) Creighton, T. E., *Protein structure*, Ed. Oxford University Press, New York, 1996, pp. 261-297.
- 7) Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M., Martial, J. A., Hol and W. G., 1995, Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions, *Protein Sci.*, 4:2594-604.
- 8) Eienthal, R. and Cornish-Bowden, A., 1998, Prospects for antiparasitic drugs. The case of *Trypanosoma brucei*, the causative agent of African sleeping sickness, 273:5500-5.

- 9) Enriquez F., S., 2005, Reactividad de los residuos de cisternas de la triosafosfato isomerasa de *Giardia lamblia* a agentes derivatizantes específicos de cisteína, Tesis para obtener el grado académico de maestro en ciencias biológicas (Biología experimental), Facultad de Ciencias, UNAM.
- 10) Erlich, H. A., PCR Technology principles and applications for DNA applications for DNA amplification, Ed. Stockton press, New York, 1989, pp. 61-70.
- 11) Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R. A., Rojo-Dominguez, A. y Perez-Montfort, R., 1995, Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase, Chem Biol., 2:847-55.
- 12) Harris T. K., Cole R. N., Comer F. I. y Mildvan, A. S., 1998, Proton transfer in the mechanism of triosephosphate isomerase, Biochemistry, 37:16828–16838.
- 13) Henze, K. and Martín, W., 2003, Essence of mitochondria, Nature, 426:127-128.
- 14) Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R., 1989, Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, Gene, 77:51-59.
- 15) <http://www.biotoools.net/esp/tecnica/t3.htm>
- 16) http://www.seimc.org/control/revi_Para/Giardia.htm
- 17) <http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2001184/index.html>
- 18) Kohlhoff, M., Dahm, A. and Hensel, R., 1996, Tetrameric triosephosphate isomerase from *hyperthermophilic archaea*, FEBS lett, 383:245-250.
- 19) Lakowicz, J. R., Principles of fluorescence spectroscopy, 2nd Edition, Ed. Kluwer Academic/plenum, New York, 1999, pp. 1-23.
- 20) Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C. and Petsko, G. A., 1990, Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution, Biochemistry, 29:6609-18.
- 21) López-Velázquez G., Molina-Ortiz, D., Cabrera, N., Hernández-Alcántara, G., Peon-Peralta, J., Yépez-Mulia, L., Pérez-Montfort, R., and Reyes-Vivas, H., 2004, An unusual triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *G. lamblia*, Proteins: Struct. Funct and bioinformatics, 55:824-834.

- 22) Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K., 1999, The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures, *Proteins*, 37:441-53.
- 23) Maithal, K., Ravindra, G., Balaram, H., and Balaram, P. (2002) Inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by chemical modification of an interphase cysteine. *J. Biol. Chem.* 277, 25106-25114.
- 24) Maldonado, E. , Soriano-Garcia, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A. and Perez-Montfort, R., 1998, Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes, *J Mol Biol.*; 283:193-203.
- 25) Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A. and Hol, W. G., 1994, Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme, *Protein Sci.*, 3:810-21.
- 26) Maron, S. H. y Prutton, C. F., *Fundamentos de fisicoquímica*, Ed. Limusa Wiley, México, 1968, pp. 787–812.
- 27) Molina O., M. D., 2000, Amplificación por PCR del gen para la triosafosfato isomerasa (TIM) del parásito intestinal *Giardia lamblia*, Informe de actividades del servicio social, Unidad Xochimilco, UAM.
- 28) Mowatt, M.R. Weinbach, E. C, Howard, T. C., Nash, T. E., 1994, Complementation of an *Escherichia coli* glicólisis mutant by *G. lamblia* triosephosphate isomerase. *Exp. Parasitol.*; 78:85-92.
- 29) Noble, M. E., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K., Mainfroid, V., Goraj, K., Gohimont, A. C. and Martial, J. A., 1993, Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 49:403-17.
- 30) Nagano, N., Oregon, C. A. y Thornton, J. M., 2002, One fold with many functions: The evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions, *J. Mol. Biol.*, 321:741–765.

- 31) Pace, N. C., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, V., 1995, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.*, 4:2411-242.
- 32) Pattanaik, P., Ravindra, G., Sengupta, C., Maithal, K., Balaram, P. and Balaram, H., 2003, Unusual fluorescence of W168 in *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase, probed by single-tryptophan mutants, *Eur J Biochem.*, 270:745-56.
- 33) Reyes-Vivas, H., Rodríguez-Romero, A., Peon-Peralta, J., Mendoza-Hernández, G., Hernández-Alcántara, G., De la Mora-De la Mora, I., Díaz, A., Domínguez-Ramírez, L., López-Velázquez, G., Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *G. lamblia* are related to oligomerization and activity. *Proceso de publicación.*
- 34) Rodríguez-Romero, A., Hernandez-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A. and Fernandez-Velasco, D. A., 2002, Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*, *J Mol Biol.*, 322:669-75.
- 35) Ruan, K. y Balny, C., 2002, High pressure static fluorescence to study macromolecular structure – function, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595:94–102.
- 36) Schaechter, M., Medoff, G., Eisenstein, B. I., *Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas*, Ed. Panamericana, México, 1994, pp. 62–65.
- 37) Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R. and Wierenga, R., 1996, Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies, 5:229-39.
- 38) Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., and Wierenga, R. K., 1997, A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* 36:9655-9662.
- 39) Smith, D. J., Maggio, E. T., and Kenyon, G. L., 1975, Simple alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes, *Biochemistry*, 14, 766-771.
- 40) Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., Van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M. and Lucocq, J. M., 2003, Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation, *Nature*, 426:172-176.
- 41) Upcroft J, A, Upcroft P., 1993, Drug Resistant and *Giardia*. *Parasitology Today*, 9:187-190.

- 42) Upcroft, J. and Upcroft, P., 1998, My favorite cell: Giardia, 20:256-63.
- 43) Upcroft, P. y Upcroft, J. A., 2001, Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa, Clinical Microbiology Reviews, 14:150-164.
- 44) Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P. and Murthy, M.R., 1997, Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design, Structure, 5:751-61.
- 45) Voet, D. y Voet, J. G., Bioquímica, Ed. Omega, México, 2000, pp.467, 468, 889, 890, 898 y 899.
- 46) Walden, H., Bell, G. S., Russell, R. J., Siebers, B., Hensel, R. and Taylor, G. L., 2001, Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase, J Mol Biol., 306:745-57.
- 47) Wierenga, R. K., Noble, M. E., Vriend, G., Nauche, S. and Hol, W. G., 1991, Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex, J Mol Biol., 220:995-1015.
- 48) Williams, J. C., McDermott, A. E., 1995, Dynamic of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated, Biochemistry, 34:8309-8319.
- 49) Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M. and Wierenga, R. K., 1999, Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power, Protein Eng., 12:243-50.

APÉNDICES

Apéndice I: Fluorescencia.

La fluorescencia de los W en las proteínas puede ser usada como prueba para relacionar el medio polar y con ello, detectar y seguir, los cambios conformacionales de las proteínas. Con esta información se puede obtener la función, estructura, desdoblamiento de las proteínas y las interacciones moleculares. Para asegurarse de que la emisión de fluorescencia solo provenga de los residuos de W, sin ningún disturbio de la excitación de los residuos de Y y F, la proteína regularmente se excita a 295 nm o a longitudes de onda más largas, donde la Y y la F no absorben ³⁵. En proteínas que contienen residuos de Y y W, la fluorescencia de Y es escasamente detectable a 280 nm porque la emisión del W es mayor. En proteínas desnaturalizadas, la emisión de los W es frecuentemente desviada a pequeñas longitudes de onda alrededor de las Y, y se puede transferir la energía de Y a W en estado nativo. Las F son despreciables, ya que la intensidad de fluorescencia es muy pequeña y además transfiere su energía a W y Y ⁶.

Es importante mencionar que para medir la fluorescencia, se deben de tomar en cuenta ciertos parámetros y los más importantes son: la longitud máxima de emisión, el tiempo de vida y la eficiencia cuántica (quantum yield). La longitud máxima de emisión es aquella longitud de onda en la que el fluoróforo tiene su máximo de fluorescencia; es decir, la longitud de onda donde flúorese más. El tiempo de vida determina el tiempo disponible para que el fluoróforo interactúe, con ó difunde, en su medio ambiente; de aquí la información disponible de su emisión. En cuanto al “quantum yield”, es el número de fotones emitidos relativos al número de fotones absorbidos ¹⁹.

En la espectroscopia de fluorescencia podemos obtener dos tipos de espectros:

- a) El de excitación.
- b) El de emisión.

El espectro de excitación se obtiene fijando cierta longitud de onda de emisión y el monocromador (ver más adelante) de excitación detecta las señales de absorción del fluoróforo. Cabe mencionar que la longitud de onda donde regularmente se fija, es el

máximo de emisión (ver más adelante) para obtener mejores resultados. En cuanto al espectro de emisión, se obtiene fijando a cierta longitud de onda de excitación y, al igual que en anterior, el monocromador detecta las señales, pero en este caso, de emisión. Cabe mencionar que estos últimos espectros, dependen de las características del fluoróforo y del medio ambiente en el que se encuentre.

Los espectros de emisión son lo más importantes para nuestros propósitos, puesto que los estudios de fluorescencia de proteínas, por lo general, se presentan en el espectro de emisión.

Por otro lado, debemos mencionar que para medir la fluorescencia es necesario utilizar un instrumento denominado espectrofluorómetro, el cual está constituido básicamente por (Figura 19):

- ✓ La fuente de luz que emite la radiación que, posteriormente interactúa con la muestra. Si irradia luz en un intervalo amplio de longitudes de onda, recibe el nombre de fuente continua. Si irradia luz sólo en ciertas longitudes de onda específicas, recibe el nombre de fuente de líneas.
- ✓ El monocromador es un sistema que permite separar bandas de luz estrechas, ya sea antes o después de la interacción de la luz con la muestra. Este se encuentra constituido por lentes, espejos, redes de difracción, prismas de refracción, rendijas, etc.
- ✓ Un compartimiento para colocar la muestra en celdas o cubetas adecuadas, dependiendo de la región del espectro utilizada.
- ✓ El detector es un sistema para la detección de la radiación que ha atravesado la muestra. Sus características dependen de la zona del espectro utilizada. Si la señal lumínica es transformada en señal eléctrica el sistema recibe el nombre de transductor.
- ✓ Sistemas para la amplificación, transformación y comparación de la señal eléctrica para un registro posterior de ella.
- ✓ Sistemas de registro de la señal mediante movimiento de agujas o señales digitales o registro gráfico o mediante sistemas computarizados.

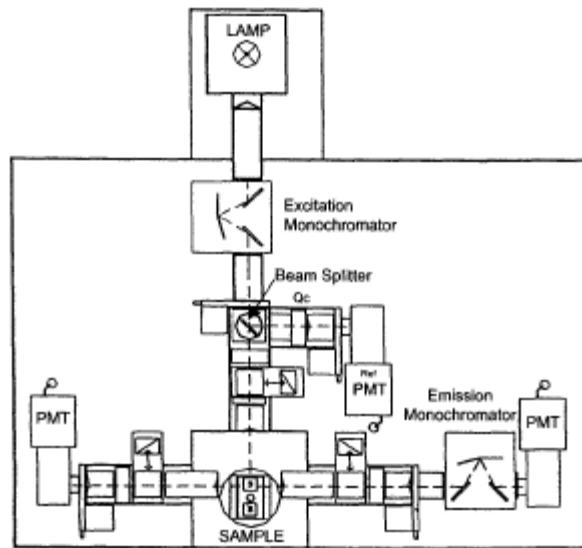


Figura 19. Esquema general de los componentes de un espectrofluorómetro.

Dentro de las fuentes de luz se encuentran las lámparas de xenón. Este gas se encuentra a alta presión y provee de luz continua en un rango de 270-700nm. Estas lámparas tienen la ventaja de que no liberan ozono. Si se obtiene un espectro de excitación a 450 nm, este espectro muestra un cierto número de picos que deben ser corregidos. Esto es característico de las lámparas de Xe.

El sistema monocromador consiste básicamente de (Figura 20):

- Una rendija de entrada que proporciona una imagen óptica estrecha de la fuente de radiación.
- Un lente colimador que hace paralela la radiación procedente de la rendija de entrada.
- Una red de difracción o un prisma para dispersar la radiación incidente.
- Otro lente colimador para reformar las imágenes de la rendija de entrada sobre la rendija de salida.
- Una rendija de salida para aislar la banda espectral deseada, bloqueando toda la radiación dispersada excepto la del intervalo deseado.

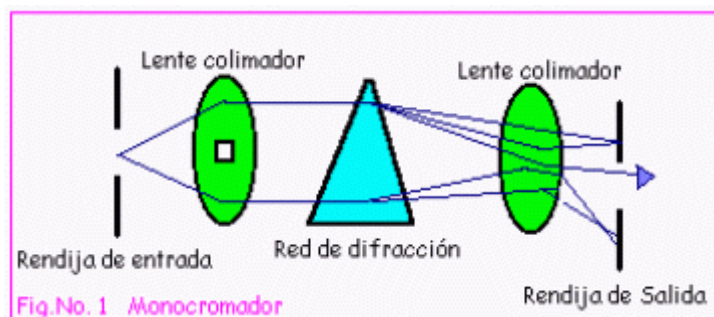


Figura 20. El sistema del monocromador.

La función principal de un monocromador es la de proporcionar un haz de energía radiante con una longitud de onda nominal y una determinada anchura de banda. La salida espectral de cualquier monocromador usado con una fuente de radiación continua, independientemente de su distancia focal y anchura de rendijas, consiste de una gama de longitudes de onda con un valor promedio de longitud que se presenta en el indicador del monocromador. Por otro lado, otra función importante consiste en el ajuste del rendimiento de energía. Este puede aumentarse, aumentando el ancho de la rendija de salida, a costa de una mayor anchura de banda espectral que puede introducir desviaciones a la ley de Beer, porque ésta exige radiación monocromática. Sin embargo, los anchos de rendijas excesivamente pequeños provocan rendimientos de baja energía en la señal del detector, afectando la sensibilidad analítica como resultado de la degradación de la relación señal-ruido.

El funcionamiento de un monocromador comprende tres aspectos correlacionados: pureza de la radiación de salida, resolución y poder de captación de luz. La pureza la determina principalmente la cantidad de radiación dispersada mientras que la resolución depende de la dispersión y perfección en la formación de la imagen. Se requiere un poder de dispersión grande y un alto poder resolutivo en un monocromador, para medir con precisión las líneas discretas en los espectros de emisión o absorción atómica y para obtener los espectros de bandas angostas de absorción molecular ¹⁷.

Cuando se elige un monocromador, generalmente se elige un monocromador de excitación que tenga gran eficiencia en el UV y uno de emisión que tenga gran eficiencia en el visible.

Debemos mencionar que la intensidad de la fluorescencia puede decrecer por una gran variedad de procesos. A esto se le denomina apagamiento o “quenching” (en el idioma inglés). Existen varios tipos de apagamiento, pero los más mencionados son: El apagamiento colisional y el apagamiento que forma complejos.

- a) El apagamiento colisional, también llamado dinámico y ocurre cuando el estado excitado del fluoróforo es desactivado por el contacto con alguna otra molécula en solución. A esta otra molécula se le denomina apagador o “quencher” (en el idioma inglés). En este caso, la fluorescencia regresa al estado estacionario durante el choque difusivo con el apagador. Cabe mencionar que las moléculas no son alteradas en el proceso.
- b) El apagamiento que forma complejos, también llamado estático y es cuando la molécula forma complejos no fluorescentes con el apagador. Esto ocurre en el estado estacionario y no cuenta con difusión y choque molecular.

Debido a lo anterior, el apagamiento de la fluorescencia puede indicar que tan accesibles son los fluoróforos a los apagadores. La velocidad de difusión de un apagador se afecta por la viscosidad del solvente y por la localización del fluoróforo. Es así que se puede investigar qué tan accesibles son los fluoróforos que se encuentran, por ejemplo, en membranas, y la permeabilidad a los apagadores. Aunque no todos los fluoróforos son apagados por los mismos apagadores, muchas veces es necesario elegir un par fluoróforo- quencher. Existen muchas sustancias que actúan como apagadores, entre ellas se encuentra el oxígeno molecular, que difunde y apaga a casi todos los fluoróforos (apagamiento dinámico). Otros apagadores son el peróxido de hidrógeno, la acrilamida, el yoduro, el óxido nitroso, la dicloroacetamida, etc. Estos apagan el grupo indol permitiendo conocer la accesibilidad de los residuos de triptófano y la permeabilidad de las proteínas a los apagadores.

Apéndice II: Geles de agarosa al 1%.

Los ADN's purificados, digestiones, PCR's, se corrieron en geles de agarosa al 1% (P/V) preparada en amortiguador TBE (tris-boratos 100 mM, EDTA 2 mM, pH = 8.0). La muestra se cargó en el gel con un amortiguador de carga que contiene azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 0.25%, glicerol en agua al 30% (para un volumen final de 10 µl agregar 2 µl del amortiguador de carga) mas 5 µg/mL de bromuro de etidio. La electroforesis se llevó a cabo entre 100 y 120 V durante 30 minutos, observando el frente de corrimiento con los colorantes agregados al amortiguador de carga. Una vez llevada a cabo la electroforesis, se observan las bandas en un transiluminador de luz UV.

Apéndice III: Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Las mutaciones se realizaron con ayuda de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). En esta técnica, una muestra de ADN desnaturalizado se incuba en presencia de ADN polimerasa y dos oligonucleótidos cebadores que dirigen a la ADN polimerasa en la síntesis de nuevas hebras complementarias. Cada uno de los múltiples ciclos de este proceso dobla aproximadamente la cantidad de ADN presente, con lo que, empezando con una única copia del gen, el ADN se amplifica exponencialmente. En cada ciclo, las dos hebras del ADN dúplex se separan por desnaturalización técnica, los cebadores se aparean con sus segmentos complementarios en el ADN y la ADN polimerasa dirige la síntesis de las hebras complementarias. El uso de una ADN polimerasa estable al calor (de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*) elimina la necesidad de añadir nuevo enzima después de cada etapa de desnaturalización térmica. Así pues, cada ciclo de amplificación se controla sencillamente variando la temperatura ⁴⁵.

Veinticinco ciclos de amplificación por PCR aumentan la cantidad de secuencia de ADN en aproximadamente un millón de veces, con gran especificidad. De hecho, se ha demostrado que este método puede amplificar un ADN específico que está presente una única vez en una muestra de 10^5 células. Sin embargo, la presencia de contaminaciones, en el laboratorio o en la muestra a amplificar, debe ser evitada, ya que se podrían obtener productos de amplificación inespecíficos ⁴⁵.

Ⓢ Ciclos:

Cada ciclo comprende los siguientes tres pasos:

- 1) Desnaturalización: El ADN se calienta hasta que se separan las cadenas simples.
- 2) Apareamiento: Las cadenas se aparean con un par de oligonucleótidos sintéticos específicos, de los cuales uno es complementario al extremo 5' del gen o fragmento de ADN que se desea amplificar y el otro se aparea con el extremo 3' del mismo, pero en la cadena opuesta.
- 3) Extensión: Los oligonucleótidos actúan como iniciadores para que la ADN polimerasa termoestable sintetice a partir de los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) que usa como sustrato, las dos nuevas cadenas de ADN complementarias a las cadenas originales. Este ciclo se repite de 20 a 30 veces, lográndose en cada ciclo doblar la cantidad del ADN blanco. Con una reacción de PCR se logra amplificar de 10^6 a 10^7 veces el gen de interés ¹⁵.

Posteriormente, basta un análisis directo por cortés con enzimas de restricción o hibridación con sondas no radiactivas para comprobar la identidad del gen amplificado. La técnica permite además el análisis simultáneo de dos o más secuencias (PCR multiplex).

Ⓢ Oligonucleótidos:

La elección de primers u oligonucleótidos debe ser cuidadosamente calculada, y normalmente es el factor más crítico a la hora de diseñar una amplificación (sea utilizando primers específicos, que identifican una secuencia única, o primers degenerados, que identifican varias secuencias de diferentes organismos). Habitualmente, los primers suelen tener un tamaño de 18 a 25 nucleótidos.

En general, la pareja de primers utilizada en una amplificación debe tener una temperatura de alineamiento similar, con un máximo de 5 °C de diferencia entre ellos.

Se recomienda revisar los posibles sitios de complementariedad entre primers y el ADN molde. Además, los primers no deben ser auto-complementarios, con el fin de evitar

formación de estructuras secundarias y dímeros de primers que podrían bajar la eficiencia global de la reacción.

Ⓢ Temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos:

La temperatura de alineamiento (T_m) se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T) - 5$$

G, C, A, T - número de los correspondientes nucleótidos en el primer.

La temperatura de hibridación o alineamiento debe ser aproximadamente 5 °C menor que la temperatura de fusión. En algunos experimentos, la temperatura de alineamiento puede ser hasta 15 °C más baja que la temperatura de fusión.

Ⓢ Concentración de $MgCl_2$:

Los iones Mg^{+2} son necesarios para la correcta catálisis de las ADN polimerasas. Sin embargo, forman complejos con los dNTP's, primers y moldes de ADN, disminuyendo la eficiencia de la reacción.

Una concentración baja de iones Mg^{+2} resulta en un bajo rendimiento de amplificación, mientras que una concentración excesiva puede causar la obtención de productos inespecíficos, así como disminuir la fidelidad de copia.

A una concentración final de dNTP's de 0.2 mM, la concentración habitual de $MgCl_2$ suele estar en el rango de 2.0 ± 0.25 mM.

Ⓢ dNTP's:

La concentración final más habitual en una reacción de amplificación para este reactivo es 200 μ M. Es fundamental tener una concentración equimolar de los cuatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ya que el desequilibrio en las concentraciones, aunque sea tan sólo en un dNTP, disminuye el rendimiento de la reacción, y favorece la incorporación errónea de

nuevas bases, con lo que aumenta la tasa de error de copia. Cuando se requiere la máxima fidelidad de copia, la concentración final de dNTPs debe estar en el rango de 10-50 μM , ya que la fidelidad de síntesis es máxima en estos valores.

El ADN molde:

Debe calcularse cuidadosamente la concentración inicial de ADN molde añadido a la reacción. Como regla general, el rango de concentraciones debe estar entre 0.01 -1 ng para ADN de plásmido o fago, y 0.1 -1 μg para ADN genómico, en un volumen total de reacción de 100 μl .

El uso de cantidades excesivas de ADN molde reduce el rendimiento de la reacción, ya que puede inhibir la polimerasa (inhibición por exceso de sustrato), o bien aumentar la cantidad de productos inespecíficos de amplificación.

ADN polimerasa:

Habitualmente, se suelen utilizar de 2 a 3 unidades de ADN polimerasa en una reacción de volumen 100 μl . Concentraciones superiores de ADN polimerasa pueden causar la síntesis de productos inespecíficos.

Apéndice IV: Células competentes.

Las células competentes se prepararon por incubación en un amortiguador con cloruro de rubidio y calcio para la modificación de la membrana celular. Un cultivo de 100 mL y $A_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0.6 se centrifugó a 2500 rpm durante 25 minutos. El botón celular se resuspendió en 40 mL de amortiguador TfbI (CH_3COOK 30 mM, MnCl_2 50 mM, RbCl 100 mM, CaCl_2 10 mM, glicerol 12% y $\text{pH} = 5.8$) y se incubó en hielo durante 2 horas. Posteriormente, las células se volvieron a centrifugar y el botón se resuspendió en 4 mL del amortiguador TfbII (MOPS 10 Mm $\text{pH} = 7.0$, CaCl_2 75 mM, RbCl 10 mM y glicerol 12%) incubando en hielo durante 1 hora. Toda la técnica se realizó en condiciones de esterilidad. Se prepararon células competentes de varias cepas, realizando los controles respectivos para determinar la eficiencia de transformación, con ADN's previamente purificados.

Apéndice V: Cuantificación de proteína por el método del Ácido Bicinconínico.

Debido al amortiguador con el que se trabajaron las proteínas, los métodos de cuantificación de Lowry y Bradford no fueron adecuados puesto que no tienen tanta tolerancia a las sales como el método del ácido bicinconínico (BCA). De modo que las proteínas se cuantificaron por el método del BCA con el BCA Protein Assay Reagent Kit de Pierce. Este método combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por acción del enlace peptídico en medio alcalino (reacción de Biuret) con la determinación colorimétrica altamente sensible del catión Cu^{1+} usando ácido bicinconínico. El producto de color morado de esta reacción se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso. El complejo soluble formado presenta una fuerte absorbancia 562 nm, la cual es lineal con respecto a la concentración de proteína en un rango de 20 a 200 $\mu\text{g/mL}$. La cuantificación se realizó interpolando los valores problema en una curva patrón de albúmina sérica bovina³⁹.

Para preparar el reactivo del BCA, se sigue:

A. Para el reactivo A.

Tabla 7. Concentraciones de reactivos para BCA.

<i>Compuesto.</i>	<i>Concentración de reactivo (mM).</i>
<i>BCA (pierce).</i>	26
<i>Na_2CO_3 anhidro.</i>	161.3
<i>Tartrato de Na y K * $4\text{H}_2\text{O}$</i>	6.4
<i>NaOH lentejas.</i>	100
<i>NaHCO_3 anhidro.</i>	112.6

- Para preparar este reactivo, todo el material a usar debe estar perfectamente limpio.
- Se disuelven las sales en H_2O_d , en un vaso de precipitado con agitación constante.
- Ajustar pH a 11.3 con sosa 10 N y aforar al volumen final establecido.
- La solución se pasa a un frasco contenedor y se almacena a 4 °C.

B. Para el reactivo B.

- Se usa una concentración de 160.2 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- Se disuelve y se afora al volumen final establecido con H_2O_d .

La relación de los reactivos es 50A:1B.

Apéndice VI: Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

La calidad de la expresión para las diferentes condiciones probada en diferentes enzimas, así como el monitoreo de las purificaciones de las TIM's se observó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) usando el método de Shagger & Von Jagow. Se corrieron aproximadamente entre 5 y 10 μg de proteína en cada caso disueltos en una solución desnaturizante (Buffer Cocktail, agregar aproximadamente 5 μl) que contenía amortiguador Von Jagow 0.0025M, SDS 10%, glicerol 1.5%, azul de bromofenol ~0.1% y cuando se requería se agregó DTT ~0.7 mM. Los geles se corrieron a 90 V, 30 minutos / 135 V, 2 horas; se tiñeron con una solución de tinción que contenía azul de Coomassie R 0.1%, metanol 30%, ácido acético 10%. Se sumerge el gel en esta solución y se calienta en el horno de microondas durante 2 minutos y se destiñeron con H_2O_d en horno de microondas con ciclos de 10 minutos.

La composición de los geles se muestra a continuación:

Tabla 8. Composición de geles de poliacrilamida.

	<i>Separador (6 mL) 16%.</i>	<i>Concentrador 4%</i>
<i>Poliacrilamida *</i>	<i>3.2 mL</i>	<i>0.533 mL</i>
<i>Amortiguador de Von Jagow</i>	<i>2 mL</i>	<i>1 mL</i>
<i>Glicerol 80%</i>	<i>0.8 mL</i>	<i>H_2O_d 2.46 mL</i>
<i>PSA 10%*</i>	<i>30 μL</i>	<i>30 μL</i>
<i>TEMED</i>	<i>3 μL</i>	<i>3 μL</i>

* Mezcla de acrilamida 30% (P/V) y bis-N,N'-metileno-bis-acrilamida 1% (P/V).

* Persulfato de amonio

Se utilizó un amortiguador superior (Tris 0.1 M, tricina 2 M, SDS 0.1% y pH = 8.25) y uno inferior (Tris HCl 0.2 M y pH = 8.9) para llevar a cabo la electroforesis del gel de poliacrilamida. Donde el amortiguador superior corresponde al cátodo (-) y el amortiguador inferior, al anodo (+). El amortiguador Von Jagow contiene Tris 3M, HCl concentrado 1M, SDS 0.3%.