

TESIS

**Construcción, purificación,
caracterización y ensayos de
desnaturalización-
renaturalización de la
Triosafofato Isomerasa
mutante E110- E168.**

Alan Eduardo Viguera Ceballos

Director de Tesis: Dr. Edgar Vázquez Contreras.

Co-Directora de Tesis: Dra. Mariana Peimbert Torres.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Edgar Vázquez Contreras en el Departamento de Bioquímica en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, y en colaboración con la Dra. Mariana Peimbert Torres del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta tesis fue apoyada por el CONACYT proyecto 45024-M; se proporcionó una beca para estudios de tesis de licenciatura.

A mis padres por su constante lucha por hacer esto posible.

A mi hermano Gerardo por su apoyo y consejos.

A mi hermana Claudette que es una gran influencia.

A Fredrick y a mi sobrino (a) que viene en camino.

A Alejandra Yépez Vega por su amor y compañía en todo
momento.

A mi Tío Carlos Viguera por cuidar mi salud.

Agradecimientos

Al Dr. Edgar Vázquez-Contreras

A la Dra. Mariana Peimbert Torres

Al Dr. Alejandro Sosa Peinado.

A la Dra. Maria Elena Chánez Cárdenas

A la Dra. Georgina Garza Ramos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México a la Facultad de Ciencias, al Instituto de Química y al Laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas de la facultad de medicina.

También Quiero dedicar esta tesis a:

Alejandro Vázquez, Rafael Peña, Rogelio Fuentes, Cristina Ornelas, Manolo Prieto, Luis Urias, Javier Govea, Azul Del Olmo, Ayari Fuentes, Gerardo Melendez, Ana Carmen Reyes, Didanwee Kent, Ruth Padilla, Tania Martínez, Marcela Corona y Paola Álvarez. Que son parte importante en mi vida. A mis Amigos de la Facultad, El padrino Ricardo, Raúl, José, Juan Ulloa, Martín, Fabiola, Diana, Rodrigo el Sumo, Alejandro Ramos.

Y muy especialmente a Jorge Jiménez Rentarías y a la familia Cabrera Coria.

ÍNDICE.

Resumen	5
General	7
Índice de Figuras	9
Índice de Tablas	10
Abreviaturas	11

Índice general

Capítulo 1	12
Introducción.	
1. Generalidades de las proteínas	13
2. Plegamiento de proteínas.	21
3. Modelo de estudio del plegamiento	25
Capítulo 2	32
Hipótesis y objetivos	
1 Hipótesis	33
2 Objetivos	33
Capítulo 3	35
Materiales y métodos	
1. Técnicas Básicas de Biología Molecular.	36
2. Diseño y Construcción de la proteína mutante	44
3. Expresión de la quimera	46
4. Purificación de la proteína mutante.	46
5. Determinación de la concentración de proteína	47
6 Caracterización de la quimera	47
Apéndice Capítulo 3 Recetas	49
Capítulo 4	50
Resultados y Discusión	
1. Construcción de la proteína E110-E168	51
2. Secuencia de la quimera	56
3. Expresión de la quimera	57
4. Purificación	58

5. Concentración de Proteína	62
6. Caracterización de la proteína	62
Capítulo 5	70
Conclusiones y perspectivas.	
Referencias	73

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estructura básica de los aminoácidos	13
2. Aminoácidos no polares alifáticos	14
3. Aminoácidos no polares aromáticos	15
4. Aminoácidos de cadena lateral sin carga	16
5. Aminoácidos con carga eléctrica	17
6. Reacción para formar el enlace peptídico	17
7. Niveles de estructura que se presentan en las proteínas	20
8. Embudo de energía libre	24
9. Triosafosfato Isomerasa	27
10. Reacción catalizada por la Triosafosfato isomerasa	28
11. Sitio Activo TIM	29
12. Oligonucleótidos	37
13. Diseño teórico de PCR	38
14. Condiciones termociclador PCR 1	39
15. Condiciones termociclador PCR 2	39
16. Condiciones termociclador PCR 3	41
17. Condiciones termociclador PCR 4	41
18. Condiciones termociclador PCR 4.1	42
19. Tratamiento con Taq polimerasa	43
20. Vector pGEM-T	44
21. Geles de Agarosa 1%	53
22. Cortes con enzimas de restricción	55
23. Ensayos de expresión	58
24. Electroforesis en gel de acrilamida 12%	59
25. Electroforesis SDS-PAGE	60
26. Electroforesis Mono-Q	61
27. Desnaturalización de la quimera	63
28. Espectros de fluorescencia Comparación Tc TIM	65
29. Espectros de fluorescencia Comparación Tb TIM.	66
30. Espectros de fluorescencia Comparación Quimera.	67
31. Triosafosfato Isomerasa mutante E110-E168	69

ÍNDICE DE TABLAS

1. Glucolisis	28
2. Alineamiento de secuencias	30
3. Patrón de plegamiento de Tc TIM y Tb TIM	31
4. Comparación de TIM de diferentes especies	31
5. Fragmentos obtenidos de cada ensayo de PCR	52
6. Digestión con enzimas de restricción	54
7. Alineamiento de las secuencias	57
8. Resultado de la medición de actividad	61
9 caracterización de la quimera	62
10. Desnaturalización de la quimera	63
11. Actividad de Tc TIM y Tb TIM mutante E110-E168	64
12. Tc TIM	65
13. Tb TIM	66
14. Quimera	67

ABREVIATURAS.

A	Agregados
"A"	Adenina
Å	Anstrongs
CM	carboximetil
COOH	grupo carboxilo
DDT	Ditiotreitol
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiamin-tetraacético
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
Gdn-HCl	Clorhidrato de guanidinio
IF	Intensidad de Fluorescencia
MES	(ácido 2-[N-Morfolino] etansulfónico)
NaN ₃	Azida de sodio
N ₂	dímero no nativo
N ₂ *	dímero nativo
NH ₃	grupo amino
PCR	reaccion en cadena de la polimesasa, del ingles "Polimerase Chain Reaction"
PMSF	Fenilmetilsulfonilfloruro
SCM	centro espectral de masa, del inglés "spectral center of mass"
SDS-PAGE	docecil sulfato de sodio- electroforesis en gel de poliacrilamida
Tb TIM	triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
Tc TIM	triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA	Trietanolamina
TED	amortiguador que contiene TEA, EDTA y DTT
TIM	triosafosfato isomerasa
U ₂	monómero desplegado
2N	monómeros compactos
E110-E168	Triosafosfato Isomerasa diseñada con el extremo amino de Tb TIM hasta el aminoácido 109, de el ácido glutámico 110 al ácido glutámico 168 Tc TIM y del aminoácido 169 al extremo carboxilo Tb TIM.

RESUMEN

La Triosafosfato Isomerasa (TIM) es una proteína oligomérica generalmente homodimérica, que participa en el ciclo glucolítico asegurando la producción de Adenosin Trifosfato (ATP) catalizando la reacción 5 de la glucólisis -isomerización de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a gliceraldeído 3-fosfato (GAP)-. La TIM presenta un plegamiento tipo barril $(\alpha/\beta)_8$, cada monómero consta de 250 aminoácidos (27kD). La estructura tridimensional de la TIM de *Trypanosoma cruzi* (Tc) y *Trypanosoma brucei* (Tb) es muy parecida, ya que al alinear sus estructuras se observa un rms menor a 0.9 Å, además presentan un 74% de identidad en secuencia primaria con sólo un 13% de cambios no conservativos. A pesar de la semejanza, los estudios de plegamiento de estas dos enzimas presentan patrones de plegamiento diferentes:

La Tc TIM presenta un patrón de plegamiento reversible (Chávez-Cárdenas et. al. 2005) y la Tb TIM presenta un patrón irreversible en donde se forman agregados (Chávez-Cárdenas et. al. 2002).

En este trabajo, se realizó el cambio de la región central de la Tb TIM a la región central de la Tc TIM, a partir de experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se reporta el diseño, construcción, sobreexpresión, así como la purificación de esta proteína. Por otra parte se llevaron a cabo ensayos de desnaturalización-renaturalización seguidos por fluorescencia intrínseca. Estos ensayos indican que el cambio en esta región no modifica la recuperación de la estructura de la proteína pero disminuye notablemente la recuperación de la actividad biológica.

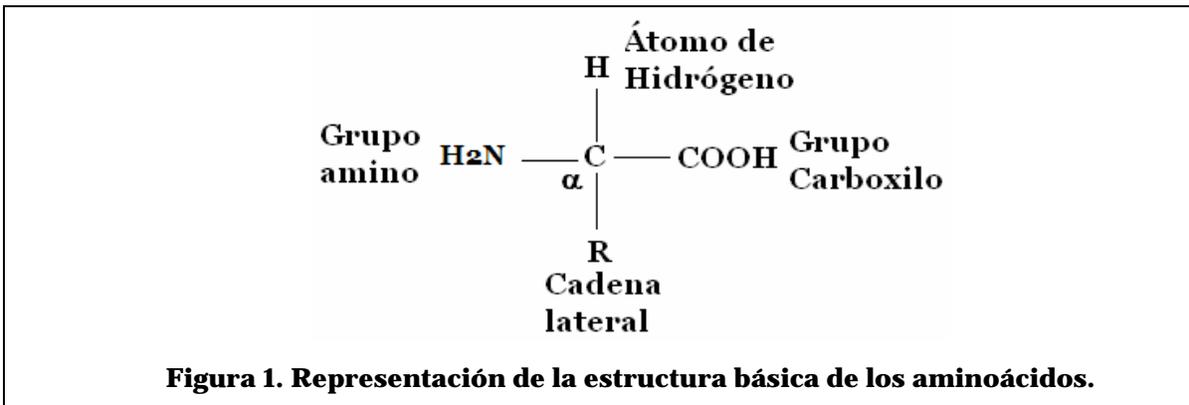
Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de las proteínas

1.1 Aminoácidos

Los 20 aminoácidos que se encuentran en las proteínas son L α - aminoácidos, contienen un grupo amino y un grupo carboxilo unidos a un mismo átomo de carbono. Estas moléculas se diferencian entre sí por la cadena lateral (R) que varía en complejidad, tamaño y carga eléctrica. También, unido al carbono α hay un átomo de Hidrógeno, lo que complementa la estructura básica de los aminoácidos (Figura 1).

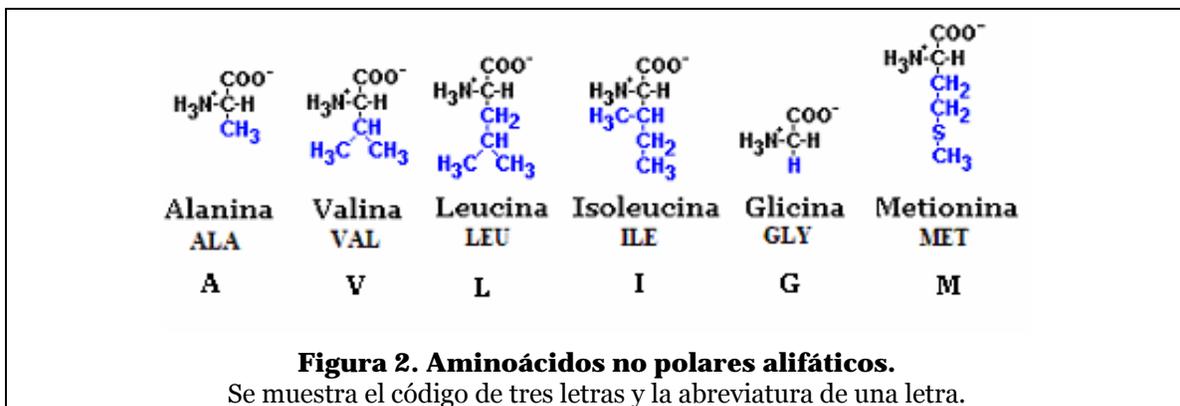


Las proteínas están compuestas por polímeros de L- α aminoácidos unidos covalentemente. En la reacción de formación del enlace peptídico se pierde una molécula de agua entre el grupo α -amino de un aminoácido y el grupo α -carboxilo de un segundo aminoácido; por lo que unidos en las proteínas se les denomina residuos de aminoácidos (Nelson D. y M. Cox. 2000).

Los aminoácidos se clasifican según las polaridades o tendencias de interactuar con el agua de sus cadenas laterales. Se pueden dividir en 3 grupos principales (Olivares-Quiroz y García Colín 2004):

I. Aminoácidos no polares alifáticos.

Las cadenas laterales de este grupo de aminoácidos son hidrofóbicas y no polares, es decir, aquellas que presentan interacciones electrostáticas repulsivas hacia las moléculas de H₂O (Olivares-Quiroz y García Colín 2004). Éstas tienden a juntarse en el interior de las proteínas para formar interacciones hidrofóbicas, que estabiliza la estructura de las proteínas. Los aminoácidos que participan en estas interacciones son la **alanina**, la **valina**, la **leucina**, la **isoleucina** y la **metionina**; que es uno de los dos aminoácidos que contiene azufre dentro de su cadena lateral (Figura 2) (Nelson D. y M., Cox. 2000). También se incluye dentro de este grupo a la **glicina**, tiene la estructura más simple en su cadena lateral con sólo un átomo de Hidrógeno, por lo que no tiene una contribución real dentro de las interacciones hidrofóbicas; sin embargo pueden acomodarse en regiones de la estructura tridimensional de las proteínas inaccesibles para otros aminoácidos.

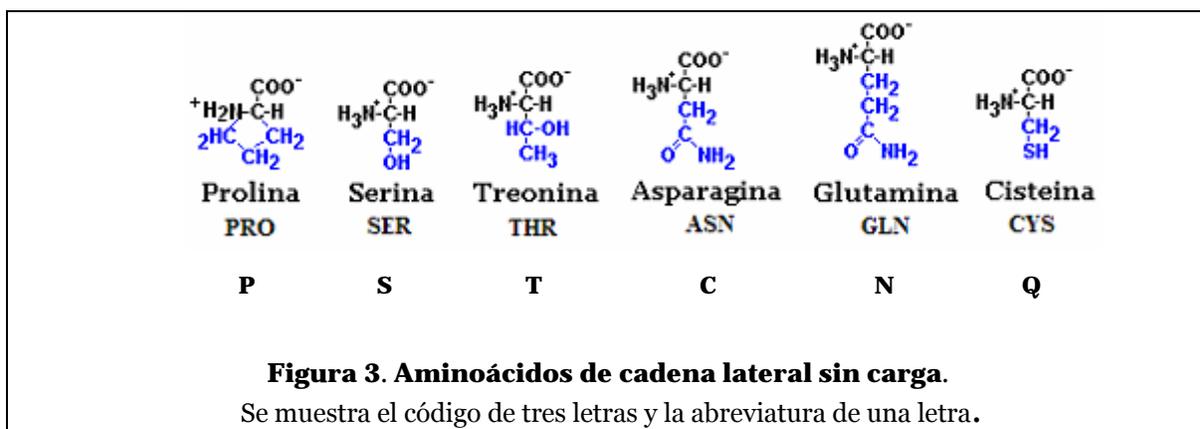


II. Aminoácidos polares sin carga.

Son aquellos cuya interacción electrostática con las moléculas del solvente es atractiva (Olivares-Quiroz y García Colín 2004). Tienen la

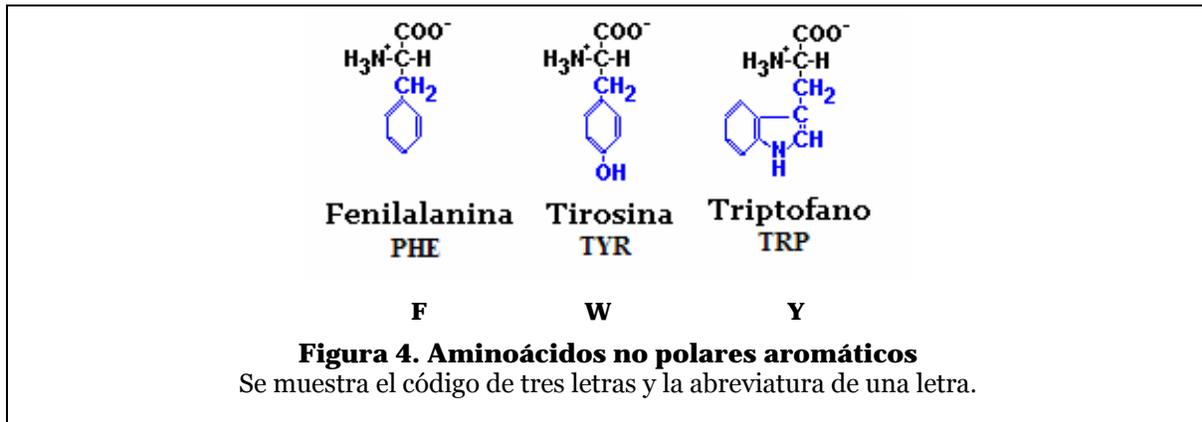
característica especial de formar puentes de Hidrógeno con las moléculas de agua del medio en el que se encuentran. Dentro de este grupo se incluyen a la **serina** y la **treonina** que contienen a un grupo hidroxilo; la **asparagina** y la **glutamina** tienen un grupo amida en su cadena lateral. La **prolina** contiene un grupo α -amino secundario, por lo tanto su estructura cíclica le confiere un carácter ligeramente polar, la rigidez de su anillo disminuye la flexibilidad conformacional de las secuencias proteicas que la contienen (Nelson D. y M., Cox. 2000).

La **cisteína** contiene un grupo sulfhidrilo el cual puede oxidarse, y con otra cisteína oxidada, puede formar un puente disulfuro. Este enlace de tipo covalente juega un papel muy importante en la estabilización de la estructura de algunas proteínas (figura 3).



Dentro de este grupo se incluye también a los aminoácidos aromáticos no polares, la **fenilalanina**, el **triptofano** y la **tirosina**, (Nelson D. y M., Cox. 2000). Este último contiene un grupo hidroxilo que la hace relativamente no polar (figura 4). Pueden participar en las interacciones hidrofóbicas gracias a sus cadenas laterales aromáticas. Todos ellos tienen la capacidad de absorber la luz ultravioleta y emitir a

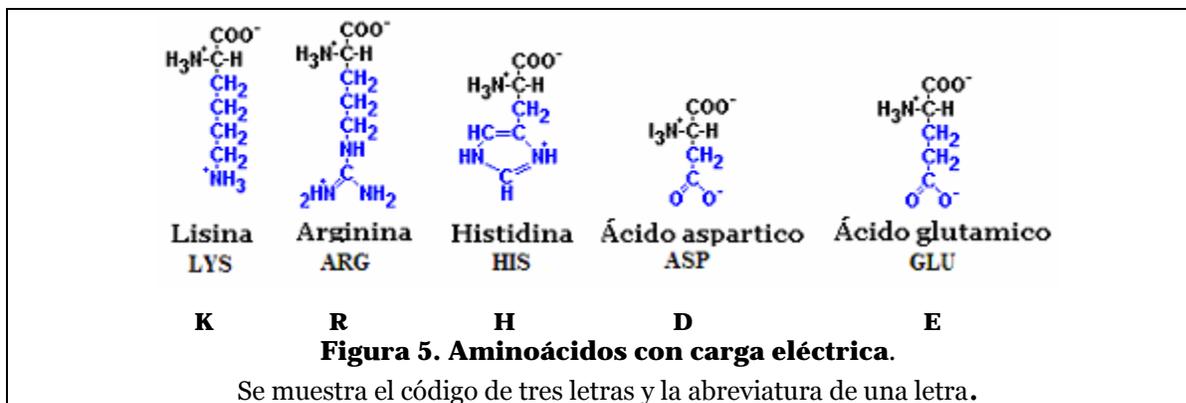
280 nm, por lo que son fluoróforos intrínsecos en las proteínas y juegan un papel muy importante en la caracterización estructural de éstas.



III. Aminoácidos polares con carga eléctrica.

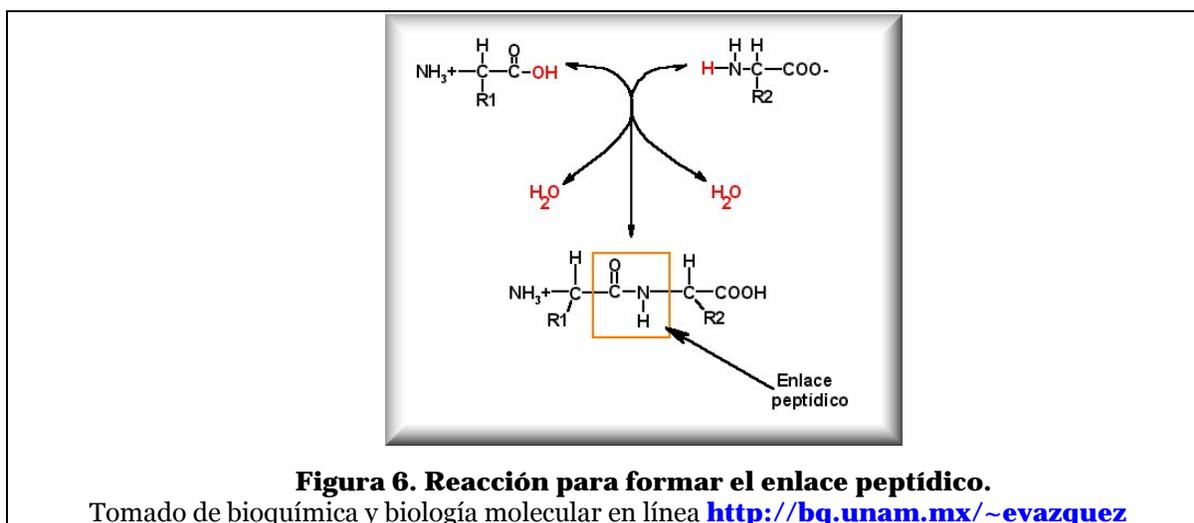
A este grupo pertenecen los aminoácidos con las cadenas laterales más hidrofílicas, su grupo residual tiene carga eléctrica distinta de cero (Olivares-Quiroz y García Colín 2004), pueden tener carga positiva o negativa. Los aminoácidos cargados positivamente son la **lisina**, la **arginina** y la **histidina** -es el único aminoácido con una cadena ionizable que puede donar o aceptar un protón a pH fisiológico de 7.4- por lo que se localiza con frecuencia en los sitios activos de las enzimas (Figura 5.)

Los aminoácidos con carga negativa son el **ácido aspártico** y el **ácido glutámico**; ambos contienen un segundo grupo carboxilo en su cadena lateral (Figura 5).



1.2 El enlace peptídico

Es la unión covalente que se forma entre el grupo alfa carboxilo de un aminoácido y el grupo alfa amino de otro, con la pérdida de una molécula de agua (Figura 6). La unión de dos aminoácidos forma un dipéptido, cuando se unen varios residuos se le denomina oligopéptido y cuando se une una gran cantidad de éstos se le denomina polipéptido o cadena polipeptídica. Dada la naturaleza lineal de las proteínas al formarse el enlace peptídico queda siempre un extremo α -amino libre o amino terminal, y un extremo α -carboxilo libre o carboxilo terminal por el cual se unen los aminoácidos (Voet D. y J. G. Voet. 1992).



1.3 Niveles de estructura en las proteínas.

Existen diferentes grados de complejidad dentro de la estructura de las macromoléculas proteicas (figura 7). Definiéndose cuatro niveles principales de estructura (Nelson D. y M. Cox. 2000).

I. Estructura primaria

Corresponde a la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica y se encuentra codificada en el gen de la proteína, el número de aminoácidos presentes y el orden en que están enlazados es la traducción directa de la secuencia de codones en el ARN. Las posibilidades de estructuración a nivel primario son prácticamente ilimitadas; el número de estructuras posibles de formar, está dado por las variaciones probables de los 20 tipos de aminoácidos que componen a las proteínas (figura 7.1).

II. Estructura secundaria

Es el plegamiento que la cadena polipeptídica adopta gracias a la formación de puentes de Hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico. Los puentes de Hidrógeno se establecen entre los grupos carboxilo y amino del enlace peptídico (el primero como aceptor y el segundo como donador de H) (Nelson D. y M. Cox. 2000). De esta forma, la cadena polipeptídica es capaz de adoptar conformaciones de menor energía libre, por lo tanto más estables, y origina estructuras periódicas de disposición tridimensional conocidas como hélices α y hebras β (figura 7.2).

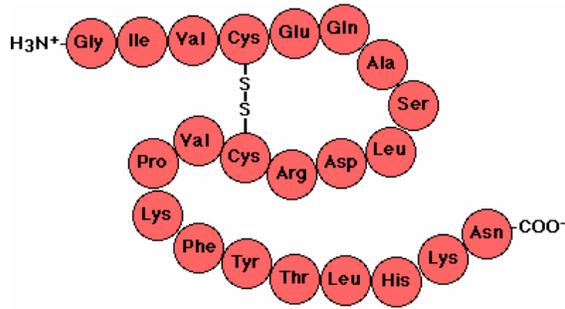
III. Estructura terciaria

Es la disposición tridimensional de todos los átomos que componen a la proteína (Figura7.3). La estructura terciaria de una proteína es la responsable directa de sus propiedades biológicas, ya que la disposición espacial de los distintos grupos funcionales de los aminoácidos determinan su interacción con los diversos ligandos en las enzimas (Nelson D. y M. Cox. 2000). Para las proteínas que constan de una sola cadena polipeptídica, la estructura terciaria es la máxima información que se puede obtener, y a través de la cual obtiene su actividad biológica. También es una disposición precisa y única en el espacio, y surge a medida que se sintetiza la proteína. Al igual que la estructura secundaria, está determinada por la secuencia de aminoácidos o estructura primaria.

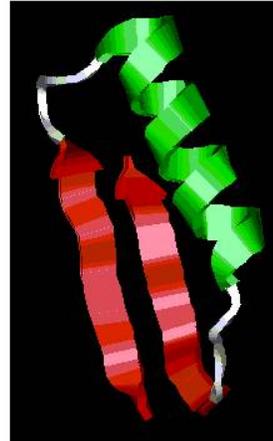
IV. Estructura cuaternaria

Cuando una proteína cuenta con más de una cadena polipeptídica se considera una proteína oligomérica, ésta se puede formar a partir de monómeros iguales (homooligómeros) o monómeros diferentes (heterooligómeros), a esto se le conoce como estructura cuaternaria. (figura7.4).

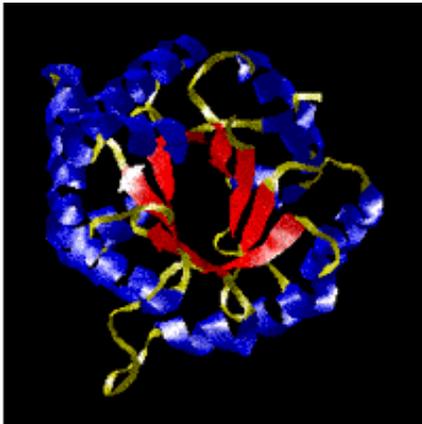
1 Estructura primaria



2 Estructura secundaria



3 Estructura terciaria



4 Estructura cuaternaria

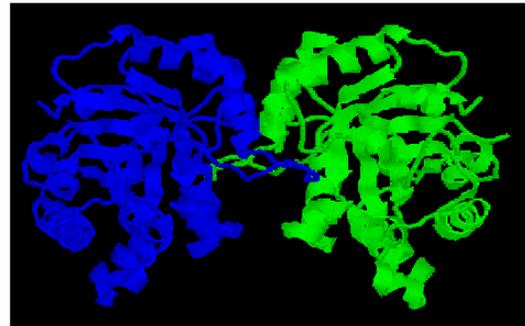


Fig 7. Representación de los diferentes niveles de estructura que se presentan en las proteínas.

1) estructura primaria cadena de aminoácidos, se muestra el extremo amino libre y el extremo carboxilo libre, y un puente disulfuro. **2) estructura secundaria** en verde hélices α , en rojo hebras β y en blanco las asas. **3) estructura terciaria** se muestra un monómero de la triosafosfato isomerasa **4) estructura cuaternaria** unión de dos monómeros de triosafosfato isomerasa para formar un homodímero.

2. Plegamiento de proteínas.

La estructura tridimensional de una proteína está codificada por su secuencia de aminoácidos, cuando una proteína se forma, en condiciones fisiológicas, podría adoptar un número colosal de conformaciones diferentes pero cada proteína tiene una estructura nativa única, que adquiere mediante el proceso conocido como plegamiento.

El sistema de plegamiento más simple que puede considerarse en una proteína puede ser de dos estados: El desnaturalizado -cadena lineal de aminoácidos sin estructura tridimensional- y el estado nativo donde la cadena polipeptídica se ha plegado para adquirir una estructura tridimensional específica. (Olivares-Quiroz y García Colín 2004.)

La posibilidad de estudiar el proceso de plegamiento de las proteínas *in vitro* nació en 1973 con los trabajos clásicos de Christian Anfinsen. En éstos se mostró como la ribonucleasa pancreática de Bovino al ser reducida por completo con mercapto-etanol en 8M de urea; y al oxidarla nuevamente ajustando la concentración de la solución con 0.1 M de ácido acético, se pliega de manera espontánea, recuperando su estructura nativa y su actividad enzimática (Anfinsen C, 1973). Estas observaciones aportaron evidencias claras de que la secuencia de aminoácidos de una proteína contiene la información necesaria para determinar la estructura tridimensional y funcional de la misma. A su vez, estos experimentos mostraron que las proteínas pueden plegarse reversiblemente, implicando que su estructura nativa es la conformación termodinámicamente más estable (Dill K. y H. Chan, 1997).

Las proteínas en las células se pliegan durante la síntesis de proteínas a una gran velocidad. En algunos casos como en *Escherichia coli*, puede formar una proteína completa de 100 residuos de aminoácidos con función biológica en alrededor de cinco segundos, ¿cómo puede suceder esto en tan poco tiempo?

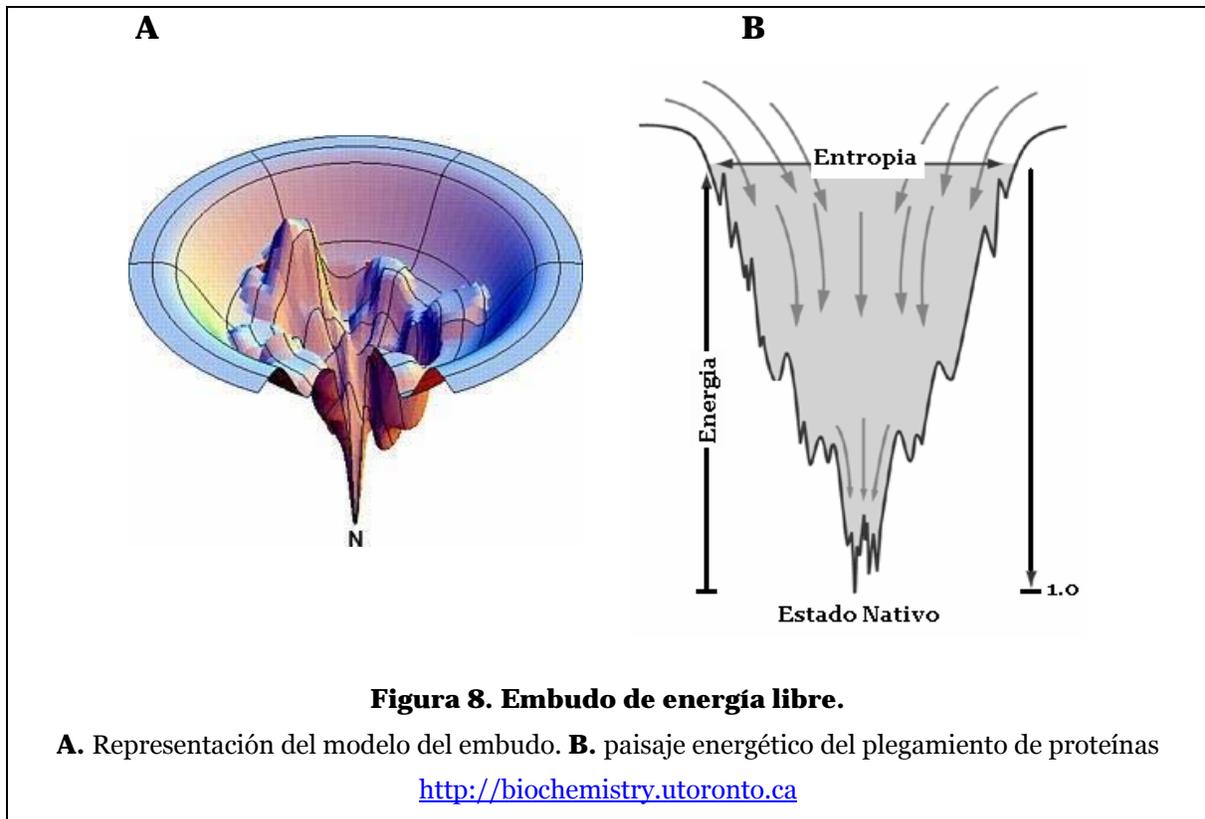
Si en este proceso el plegamiento se realiza al azar un residuo de aminoácido puede, en promedio, visitar 10 conformaciones diferentes, tendría 10^{100} diferentes conformaciones estructurales hasta encontrar el estado nativo, intentando todas las conformaciones posibles, aun cuando cada estado es visitado en un tiempo muy pequeño (10^{-13} s), entonces a ésta proteína le llevaría 10^{77} años visitar todas estas conformaciones, lo cual no es posible pues las proteínas se pliegan en el intervalo de segundos, por lo tanto el plegamiento no puede ser completamente al azar y deben existir vías para llegar a la conformación nativa. El primero en describir esto fue Cyrus Levinthal en 1968 por lo que ésta observación lleva el nombre de paradoja de Levinthal (Levinthal, C.J. 1968).

Las rutas del plegamiento pueden ser complicadas y no se han podido estudiar todos los mecanismos del proceso por el cual una proteína se pliega, pero existen algunos acercamientos para entender los procesos involucrados en el plegamiento de proteínas.

Por ejemplo se ha planteado que primero existe la formación de la estructura secundaria a nivel local y después ocurren interacciones de largo alcance como entre dos α -hélices que se unen para formar una super-estructura secundaria estable hasta formar dominios completos y así concluir el plegamiento de la proteína (Olivares-Quiroz y García Colín 2004).

También se ha planteado que el plegamiento se inicia con el colapso espontáneo de interacciones hidrofóbicas del polipéptido en un estado compacto, mediado por residuos no polares, que pueden contener una gran cantidad de estructuras secundarias, conocido como colapso hidrofóbico (Kauzmann W. 1959). Existe otro planteamiento donde se comparten características de los dos anteriores dando lugar una población de moléculas del péptido que toman rutas alternas para llegar al mismo punto en donde las conformaciones parciales van disminuyendo mientras más cerca del estado nativo se encuentran. Este mecanismo de plegamiento fue postulado inicialmente por Wetlauferen 1973 (Wetlaufer D. B. 1973) y se le conoce como Mecanismo de Nucleación

Cineticamente el plegamiento puede ser visto como un embudo de energía libre -figura 8-. Donde el estado desnaturalizado se caracteriza por un alto grado de entropía conformacional y de relativa energía libre elevada. Mientras el proceso de plegamiento avanza, la parte más angosta del embudo representa una disminución en el número de especies conformacionales presentes. A su vez, las pequeñas rugosidades dentro del embudo muestran intermediarios semiestables que atenúan el proceso de plegamiento y en el fondo del embudo se ensamblan a intermediarios hasta reducirlos a una conformación nativa (Hill et al, 2001).



2.1 Desnaturalización

Las proteínas poseen una conformación marginalmente estable, por lo que un pequeño cambio en el ambiente que las rodea puede traer como consecuencia cambios estructurales que pueden afectar su función. Esto se refleja en la pérdida de estructura tridimensional. A éste fenómeno se le denomina **desnaturalización**, aunque no implica, necesariamente, el desplegamiento completo de la proteína. (Creighton T, 1996).

La mayoría de las proteínas pueden ser desnaturalizadas por calor afectando la estabilidad de los puentes de Hidrógeno. Si la temperatura se incrementa de una manera moderada, la conformación de la proteína permanece intacta hasta que, abruptamente, pierde la estructura y la función. Estos cambios indican que el desplegamiento es

un proceso cooperativo; la pérdida de estructura en una región de la proteína desestabiliza otras regiones. Las proteínas no sólo se desnaturalizan por calor, también existen otros agentes desnaturalizantes como el pH, que afecta la carga neta de las proteínas causando repulsiones electrostáticas y la interrupción de algunos puentes de Hidrógeno, algunos solventes orgánicos como la acetona o algunos solutos como la urea o las sales de guanidino y los detergentes también afectan las interacciones hidrofóbicas, que mantienen estable el núcleo de las proteínas, aún así, ninguno de estos agentes afectan las interacciones covalentes (Nelson D. L. y M. M. Cox. 2000).

2.2 Renaturalización

La estructura terciaria de las proteínas está determinada por la secuencia de aminoácidos; la prueba más contundente sobre este hecho radica en que al desnaturalizar algunas proteínas por calor, pH o reactivos desnaturalizantes, y posteriormente eliminar el agente desnaturalizante presentan reversibilidad del estado nativo y recobrarán su actividad biológica. A este proceso se le conoce como **renaturalización** (Creighton T, 1996).

3 Modelo de estudio del plegamiento.

3.1 Antecedentes

Dos de las enfermedades parasitarias más importantes que existen actualmente son causadas por *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas en América) y *Trypanosoma brucei* (enfermedad del sueño en África).

La enfermedad de Chagas también denominada tripanosomiasis americana originada por *T. cruzi*, ha infectado entre 20 y 25 millones de individuos tan sólo en América Latina causando 50 mil muertes por año, ocupando el tercer lugar entre las afecciones parasitarias detrás de la malaria y la esquistosomiasis, según datos de la OMS.

En la enfermedad del sueño Africana originada por *T. brucei* 60 millones de personas corren el riesgo actualmente de contraerla, pero sólo cuatro millones (un 7%) tienen acceso al diagnóstico y al tratamiento. <http://www.who.int/zoonoses/diseases/trypanosomiasis/en/index.html>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que de 300 a 500 mil personas pueden hoy en día padecer la enfermedad del sueño. Se cree que sólo se conoce un 10% de los nuevos casos y de los 36 países afectados en África, 22 se encuentran entre los menos desarrollados del mundo.

El papel central que juega el metabolismo anaerobio (glucólisis), como fuente de energía en alguna parte del ciclo de vida de estos dos organismos, se ha enfocado al diseño de fármacos específicos contra estos dos agentes infecciosos, teniendo como blanco principal la inhibición de la triosafosfato isomerasa (TIM) de estos dos parásitos. Toda la información generada sobre estas enzimas es aprovechada para el diseño racional de nuevos medicamentos.

3.2 Triosafosfato Isomerasa (TIM)



Figura 9. triosafosfato isomerasa de *trypanosoma cruzi*.

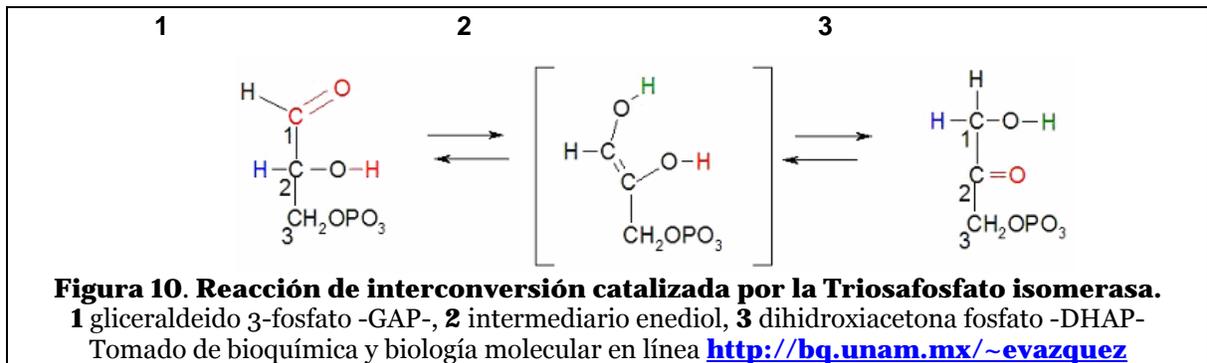
Se muestra la figura del barril de frente en el monómero de la izquierda y en el monómero de la derecha se ve de costado.

La Triosafosfato Isomerasa (TIM) es una proteína oligomérica generalmente homodimérica, cada monómero consta de aproximadamente 250 aminoácidos (27kD), y presenta un plegamiento tipo barril (α/β)₈ (figura 9). Esta enzima cataliza la interconversión entre los azúcares de 3 carbonos dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldeído 3-fosfato (GAP). Los primeros en demostrar esto fueron Meyerhof y Kiessling en 1935 (revisado en Rieder S. y Rose I. 1958). Esta reacción participa en la glucólisis en el paso número 5 (tabla 1). Solo el GAP formado en el paso 4 por la aldolasa puede continuar en los siguientes pasos de la glucólisis. El otro producto, la DHAP es convertido en GAP por la TIM, la cual cataliza esta reacción de isomerización mediante un intermediario enediol (figura 10) (Rieder S. y Rose I. 1958).

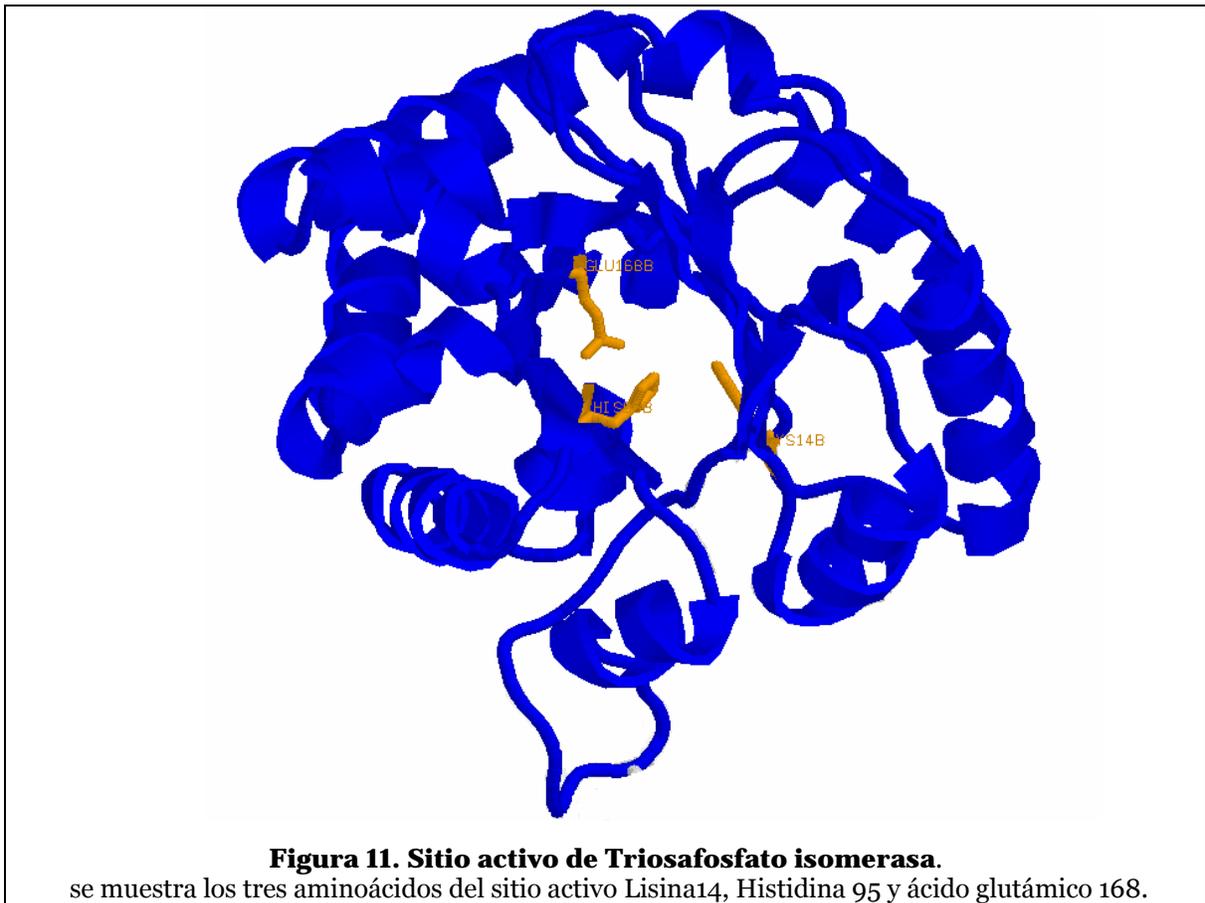
Glucólisis: Proceso metabólico también conocido como metabolismo anaerobio por el cual las moléculas de glucosa son degradadas a través de una serie de reacciones enzimáticas para producir moléculas de piruvato, durante esta secuencia de reacciones se libera energía en forma de ATP (energía química) y NADH (poder reductor). La ruptura una molécula de glucosa de seis carbonos en una molécula de piruvato de 3 carbonos ocurre en diez pasos.

Primer paso: La glucosa es fosforilada en el grupo hidroxilo en el carbono 6 por la hexocinasa.	Segundo paso: La glucosa 6-fosfato formada se transforma en fructosa 6-fosfato por la fosfoglucosa isomerasa.	Tercer paso: La fructosa 6-fosfato es fosforilada por la fosfofructocinasa-1, en el carbono 1 para producir fructosa 1,6-bisfosfato. Para estas dos fosforilaciones el ATP es el donador del grupo fosfato.
Cuarto paso: La fructosa 1,6-bisfosfato se rompe para producir dos moléculas de tres carbonos por la aldolasa, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldeido 3-fosfato (GAP).	Quinto paso: La DHAP es isomerizada a una segunda molécula de GAP por la triosafosfato isomerasa* .	Sexto paso: Cada molécula de GAP es oxidada y fosforilada por fosfato inorgánico por la glicelaldehído-3-fosfato deshidrogenada para formar 1,3-difosfoglicerato.
Septimo paso: El fosfoglicerato cinasa transfiere el grupo fosfato desde el grupo carboxilo del 1,3-bifosfoglicerato al ADP, formando ATP y 3-fosfoglicerato.	Octavo paso: La fosfoglicerato mutasa cataliza el desplazamiento del grupo fosfato entre el Carbono 2 y el Carbono 3 del fosfoglicerato en presencia de Mg ²⁺ .	
Noveno Paso: La enolasa cataliza la deshidratación reversible del ácido 2 fosfoglicérico para formar fosfoenol piruvato.	Décimo paso: El último paso de la glucólisis es la transferencia del grupo fosfato desde el fosfoenol piruvato al ADP catalizada por la piruvato cinasa.	

Tabla 1. Glucólisis.
Se describen los diez pasos de la glucólisis,* en el paso 5 participa la triosafosfato isomerasa modelo de estudio del plegamiento para éste trabajo.



La TIM se considera un catalizador perfecto. Sólo está limitado por la frecuencia de encuentros entre las dos especies, y no a los ajustes conformacionales que la proteína desarrolla con el solvente para la catálisis, o a los rearrreglos químicos entre el sustrato y la enzima (Knowles J R. 1991). Su velocidad de catalisis es entre 10^8 y 10^9 veces más rápida que en ausencia de la enzima (Straus D. *et al.*, 1985).



La TIM sólo es activa como dímero (Waley S. 1973). El sitio activo de esta enzima se encuentra en el extremo carboxilo del barril, en la cavidad que se forma por las asas contiguas a las hebras. Los aminoácidos que componen el sitio activo son el **Lys13**, **His95** y **Glu165** según la secuencia de la TIM de pollo (Straus D. *et al.*, 1985)

El patrón de plegamiento de la enzima de *T. cruzi* es reversible y presenta 4 estados (Chávez-Cárdenaz et al., 2005), mientras que el plegamiento de *T. brucei* posee un plegamiento irreversible, también de 4 estados pero forma agregados (Chávez-Cárdenas *et al.*, 2002.). Existen estudios similares para otras especies (tabla 4).

Fuente	Patrón de plegamiento	Referencia
Tc TIM	$N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U$	(Chávez-Cárdenas et al., 2002)
Tb TIM	$\begin{array}{c} A \quad A \\ \uparrow \quad \uparrow \\ N_2 \rightleftharpoons N_2^* \rightleftharpoons 2M \rightleftharpoons 2U \end{array}$	(Chávez-Cárdenas et al., 2005)

Tabla3. Patrón de plegamiento de Tc TIM y Tb TIM

Donde: N2: dímero nativo; N2*: dímero no nativo; 2M: monómeros compactos; U2: monómeros desnaturalizados

Numero de aa	Código PDB	Reversibilidad
251	1TCD	SI
250	1TPF	NO

248	1YDV	NO
248	1YPI	SI
250	1AMK	SI
253	1B9B	NO
261	1R2R	NO

Nomenclatura para el modelo de plegamiento: N₂: dímero nativo; N₂*: dímero NO nativo; 2N: monómeros compactos; 2U: monómeros de

Capítulo 2

Hipótesis y objetivos

1 Hipótesis

Es posible que al cambiar la región central de Tb TIM por la región central de Tc TIM, generando la quimera E110-E168*, el plegamiento de ésta sea reversible como en Tc TIM.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

Fabricar la proteína quimera diseñada de Triosafosfato Isomerasa E110- E168* por mutagénesis dirigida mediante ensayos de PCR, para realizar ensayos de denaturalización-renaturalización con clorhidrato de guanidina y obtener información estructural sobresaliente por medio de fluorescencia intrínseca.

*es decir: Triosafosfato Isomerasa diseñada con el extremo amino de Tb TIM hasta el aminoácido 109, del ácido glutámico 110 al ácido glutámico 168 Tc TIM y del aminoácido 169 al extremo carboxilo Tb TIM.

2.2 Objetivos Particulares

1. Diseñar el protocolo para la construcción de una proteína que tenga la secuencia del carboxilo y amino terminal de Tb TIM y la región central de Tc TIM.
2. Fabricar la quimera E110- E168 por técnicas de PCR.
3. Obtener la secuencia de la quimera que se construyó según los objetivos anteriores.
4. Sobreexpresar y purificar a la proteína quimérica.
5. Caracterizar a la proteína a través de ensayos de actividad.
6. Obtener el patrón de desnaturalización y renaturalización de la proteína quimérica.

Capítulo 3
MATERIAL y MÉTODOS

1 Técnicas básicas de biología molecular.

Los genes de Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* se encuentran clonados en el plásmido pET3a, y fueron donados por el Dr. Ruy Pérez Montfort,¹ y proporcionados por la Doctora Maria Elena Chánez Cárdenas².

¹IFC, UNAM; ² Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez.

1.1 Transformación de células Quimiocompetentes.

Para obtener una cantidad suficiente de plásmido, se transformaron células de *E. coli* Xl1- blue quimiocompetentes a las cuales se les agregaron 4 µl de DNA de Tb TIM o Tc TIM. Se les aplicó un choque térmico, incubando 20 min en hielo a 4°C, después un minuto a 42°C y 2 min en hielo; las células se recuperaron al agregar 1 mL de medio LB* estéril incubando a 37°C durante 1 hr 30 min con agitación y se pasaron a cajas de Petri con medio sólido LB* más ampicilina 10 µg/mL, y se incubaron toda la noche a 37° C.

1.2 Purificación de DNA.

La Purificación de DNA extracromosomal se llevó a cabo utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QUIAGEN) como el manual del mismo lo describe.

Se sembraron las células previamente transformadas en medio líquido LB* 10 mL mas 10 µg/mL de ampicilina dejándolas crecer toda la noche. La muestra se centrifugó a 14000 rpm, las células se resuspendieron en 250 µl amortiguador P1® y se agregó 250 µl de amortiguador de lysis P2®; se añadió 350 µl de amortiguador neutralizador N3® y se centrifugó por 10 min. El sobrenadante se pasó a una columna de

centrifugación y se centrifugó 1 min desechando el líquido sobrante, se adicionó 0.5 ml de amortiguador PB[®] y se centrifugó por 1 min desechando el líquido sobrante. Se lavó la columna con 0.75 ml de amortiguador de lavado PE[®] y se centrifugó 1 min desechando el líquido y volviendo a centrifugar 1 min. Se diluyó y recuperó el DNA en 30 µl de amortiguador de elusión EB[®] centrifugando por 1 min (QIAprep Miniprep Handbook 03/2003).

* ver apéndice del capítulo 3.

[®]Manual del Kit QIAprep Spin Miniprep.

2 Diseño y Construcción de la proteína mutante.

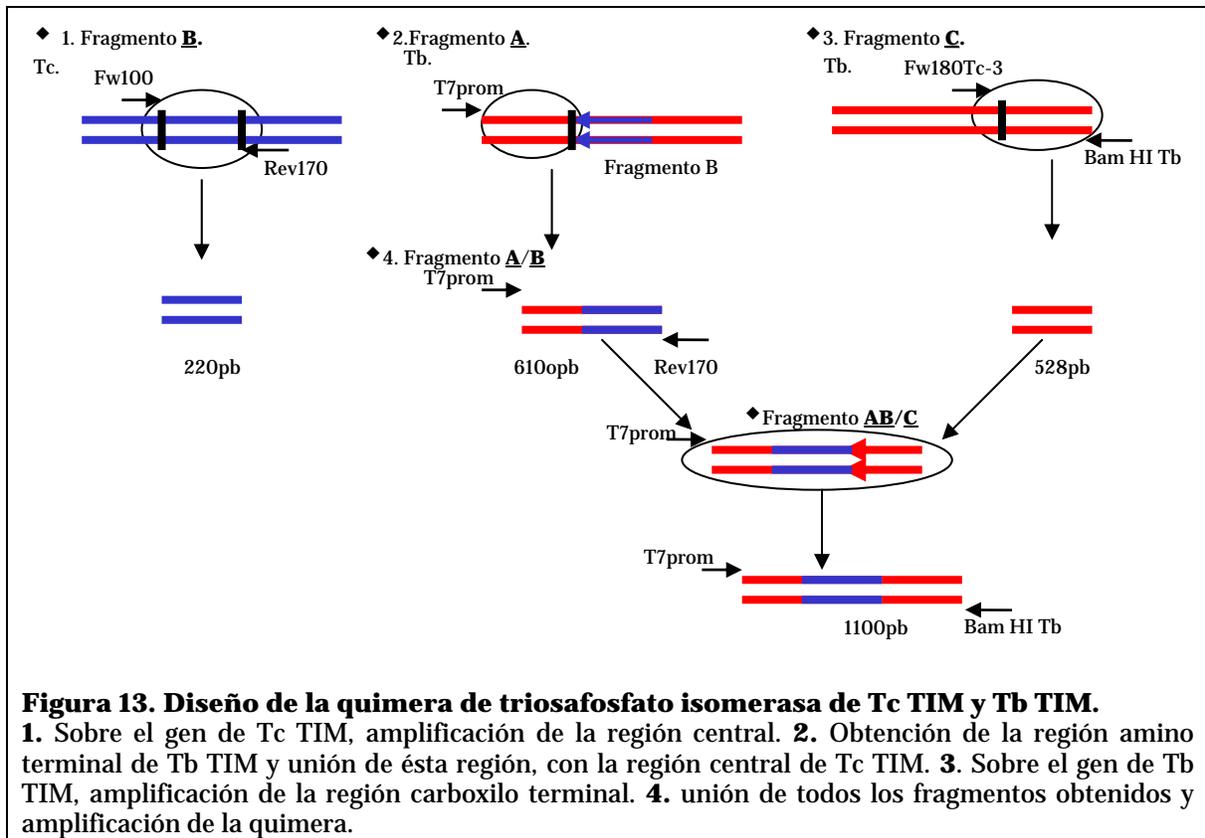
2.1 Diseño de oligonucleótidos

Tomando como base las secuencias de Tb y Tc TIM se diseñaron los oligonucleótidos que sirvieron como cebadores para la construcción del gen quimérico. (Figura 12.)

Nombre	Secuencia
Fw100	CGAGATTGTTGCGGAAAAGGTGG
Fw170	CAGCAGGCGCAGGAAGCCCAC
Rev170	CTGCGCCTG CTGC
BamH1Tb	CCGG ATCCGCGACCC
Figura 12. oligonucleótidos utilizados para la construcción de la proteína quimérica. Fw100 y Fw170 hibridación sobre la cadena codificante; Rev170 y BamH1Tb hibridación sobre la cadena no codificante.	

2.2 Diseño experimental

Se diseñó una serie de ensayos de PCR basados en las secuencias de Tb y Tc TIM, los oligonucleótidos que se mandaron a sintetizar y los posibles sitios de unión de los diferentes fragmentos a obtener en cada ensayo de PCR. (Figura13).



2.3 Construcción de la quimera.

Se realizó mediante los siguientes ensayos de PCR.

2.3.1 PCR 1 fragmento B.

Para la amplificación de la región central de Tc TIM se utilizó la siguiente reacción de PCR y las siguientes condiciones de termociclador:

Amortiguador de reacción 10 x*	5 µL
dNTP`s	5 µL
DNA Tc	4.34 µL (100 ng)
Oligo Fw 100	1 µL (200 ng/µL)
Oligo Rev 170	1 µL (200 ng/µL)
Agua	31.66 µL
Pfu Polimerasa	2 µL

* ver apéndice del capítulo 3.

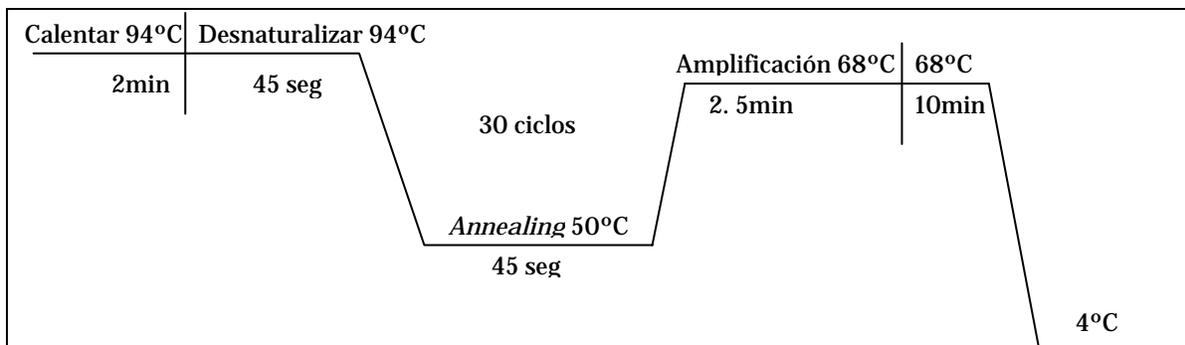


Figura14. Condiciones de termociclador para obtener el fragmeto B (PCR1)

Se calentó la muestra durante 2 min a 94°C, se utilizaron 30 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos. Temperatura de desnaturalización 94 °C durante 45 seg, temperatura de annealing 50°C durante 45 y temperatura de Amplificación 68°C durante 2.5 min. Después de los 30 ciclos se termino de amplificar aplicando 10 min 68°C y se dejó a 4°C.

Después de realizar este ensayo de PCR, se le realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%.

2.3.2 PCR 2 Fragmento A

El fragmento obtenido del PCR 1 se utilizó como oligonucleótido para obtener la región amino terminal de Tb TIM, al unirle la región central de Tc TIM utilizando la reacción de PCR y las siguientes condiciones de termociclador:

Amortiguador de reacción 10 x	5 µL
dNTP` s	5 µL
DNA Tb	1 µL (100 ng/ µL)
Oligo T7 prom	1 µL (200 ng/µL)
Oligo fragmeto B*	2, 4 y8 µL
Agua	32 µL
Pfu Polimerasa	2 µL

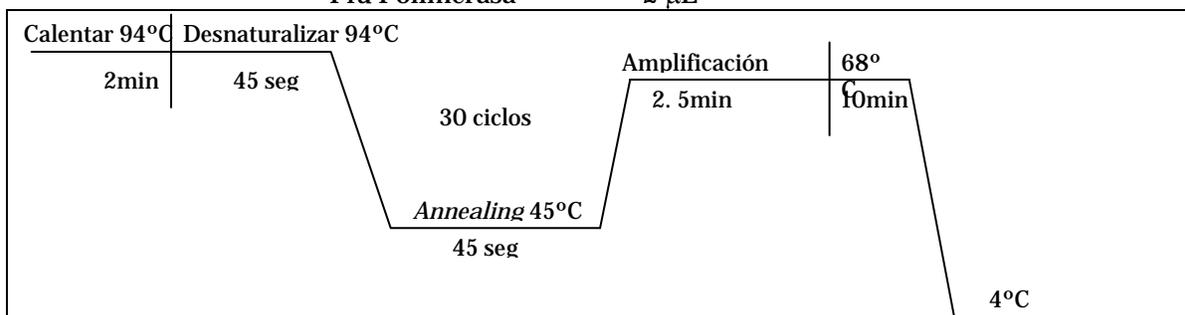


Figura15. Condiciones de termociclador para unir el fragmeto A y B (PCR2).

Se calentó la muestra durante 2 min a 94°C, se utilizaron 30 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos. Temperatura de desnaturalización 94 °C durante 45 seg, temperatura de annealing 45°C durante 45 seg y temperatura de Amplificación 68°C durante 2.5 min. Después de los 30 ciclos se termino de amplificar aplicando 68°C por 10 min y se dejó a 4°C.

*Se utilizaron varios volúmenes de el oligonucleótido fragmento B, por que se desconocía la concentración. El fragmento amplificó con 4 μL de oligonucleótido.

2.3.3 PCR 2.1 Fragmento A/B.

La muestra del PCR 2 se corrió en un gel preparativo de agarosa al 1%, se cortó la banda de 610 pb, se pasó por un jeringa de insulina agregando 200 μL de agua destilada. Para obtener una buena cantidad del fragmento A/B, fue necesario reamplificar este fragmento en agarosa con los oligos T7prom y Rev170, mediante la siguiente reacción de PCR.

Amortiguador de reacción 10 x	5 μL
dNTP` s	5 μL
Stock de agarosa	36 μL
Oligo T7 prom	1 μL (200 ng/ μL)
Oligo Rev 170	1 μL (200 ng/ μL)
Pfu Polimerasa	2 μL

Para el PCR 2.1 se utilizaron las mismas condiciones de termociclador que el PCR 2.

2.3.4 PCR 3 Fragmento C

Se amplificó la región carboxilo terminal de Tb TIM con la siguiente reacción de PCR y las siguientes condiciones de termociclador:

Amortiguador de reacción 10 x	5 μL
dNTP` s	5 μL
DNA Tb	100 ng
Oligo Fw 180 Tc-3	1 μL (20 ng / μL)
Oligo T7 term	1 μL (200 ng/ μL)
Pfu Polimerasa	2 μL

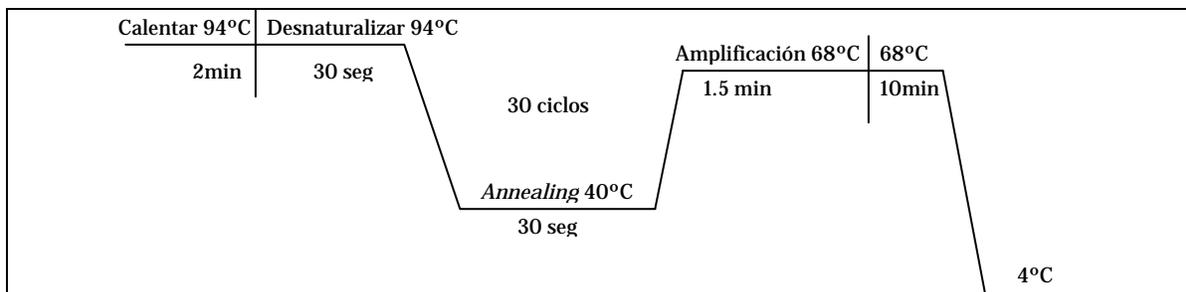


Figura 16. Condiciones de termociclador para obtener el fragmento C (PCR3).

Se calentó la muestra durante 2 min a 94°C, se utilizaron 30 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos. Temperatura de desnaturalización 94 °C durante 30 seg, temperatura de annealing 40°C durante 45 seg y temperatura de Amplificación 68°C durante 1.5 min. Después de los 30 ciclos se termino de amplificar aplicando 10 min 68°C y se dejó a 4°C.

2.3.5 PCR 4 fragmento AB/C

Se unió por hibridación el fragmento A/B con el fragmento C en la reacción de PCR y se utilizaron las siguientes condiciones de termociclador:

Amortiguador de reacción 10 x	5 µL
dNTP`s	5 µL
Fragmento A/B	5µL (100 ng/µL)
Oligo Fragmento C*	4µL, 10µL
Oligo T7 prom	1 µL (200 ng/µL)
Agua	31 µL, 22 µL
Pfu Polimerasa	2 µL

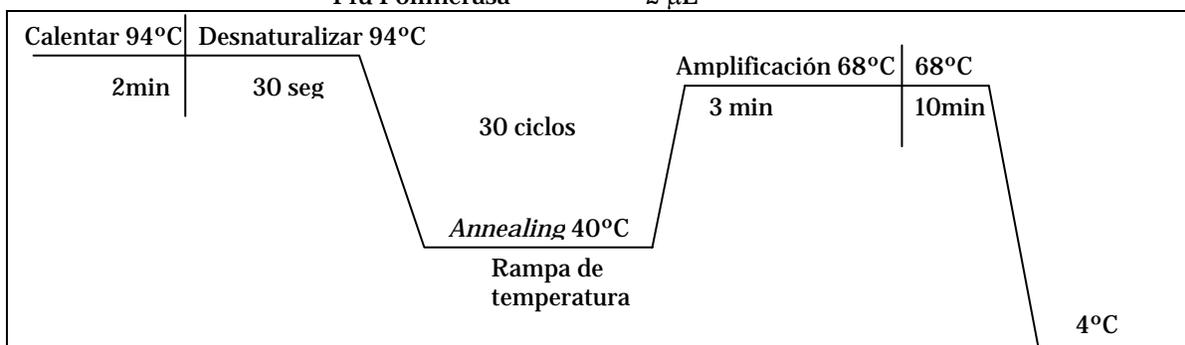


Figura 17. Condiciones de termociclador para unir los fragmentos AB/ C.

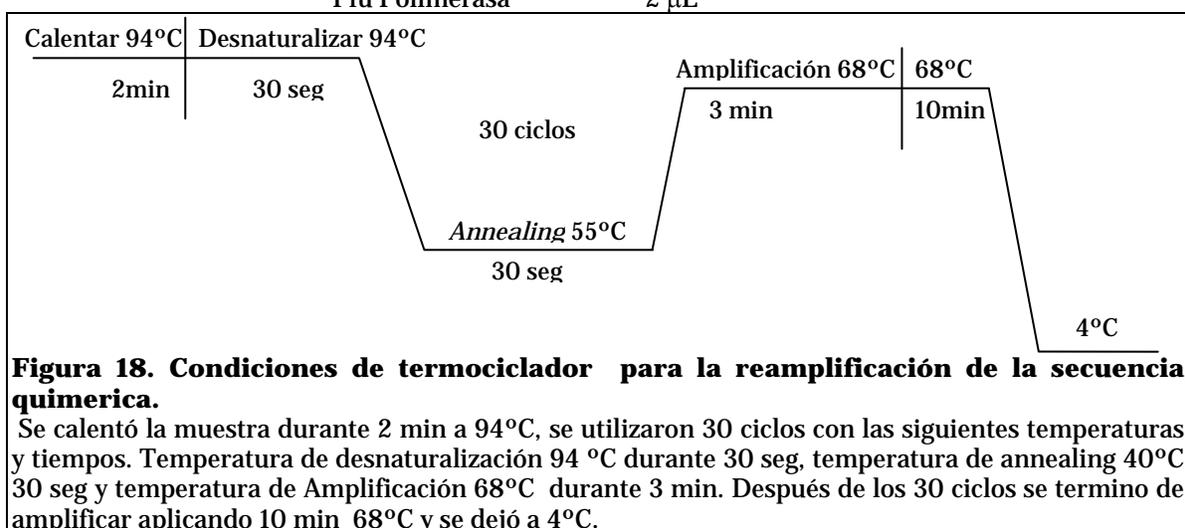
Se calentó la muestra durante 2 min a 94°C, se utilizaron 30 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos. Temperatura de desnaturalización 94 °C durante 30 seg, para la temperatura de annealing se utilizó una rampa de 40°C a 68°C a 1°C/seg y temperatura de Amplificación 68°C durante 3 min. Después de los 30 ciclos se termino de amplificar aplicando 10 min 68°C y se dejó a 4°C.

*Se utilizaron dos volúmenes diferentes de fragmento C, por que se desconocía la concentración. Esta reacción hibridizó con 10µL.

2.3.6 PCR 4.1 Fragmento A/B/C.

Se reamplificó el producto del PCR 4 para obtener un buen rendimiento de la secuencia quimérica. Con la reacción de PCR y las siguientes condiciones de termociclador. :

Amortiguador de reacción 10 x	5 µL
dNTP's	5 µL
Fragmento A/B/C	5µL, 10µL
Oligo T7 prom	1 µL (200 ng/µL)
Oligo Bam HI Tb	1 µL (200 ng/µL)
Agua	31 µL, 26
Pfu Polimerasa	2 µL



Todos los pasos fueron evaluados mediante electroforesis en agarosa al 1% y purificados utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep®, cortando la banda del peso deseado y se agregaron 3 volúmenes de amortiguador QG® por 1 volumen de gel de agarosa al 1%, la muestra se incubó a 50°C durante 10 minutos, se agregó un volumen de isopropanol. Se centrifugó por 1 min en columna y se desecho el líquido; se añadió 0.5 ml de amortiguador QG® y se centrifugó por 1 min. Se lavó la columna con 0.75 mL de amortiguador PE® dejando reposar de 2 a 5 min y se centrifugó por 1 min se desechó el líquido sobrante y se realizó una centrifugación extra de 1 min. Se diluyó el DNA agregando 30 µl de

amortiguador EB[®] dejando reposar por 1 min antes de centrifugar durante 1 min.

[®]Manual del Kit QIAprep Spin Miniprep.

2.3.7 Tratamiento con Taq DNA polimerasa.

Ya obtenida la secuencia quimérica y purificada por banda en gel de agarosa al 1% se le realizó un tratamiento con Taq DNA polimerasa que consistió en adicionar Adeninas “A” a los extremos 3' de la secuencia quimérica mediante la reacción de polimerización con las siguientes condiciones de termociclador:

Amortiguador de reacción 10 x	6 µL
dNTP` s	4 µL
Fragmento A/B/C	50µL
Taq Polimerasa	0.2 µL

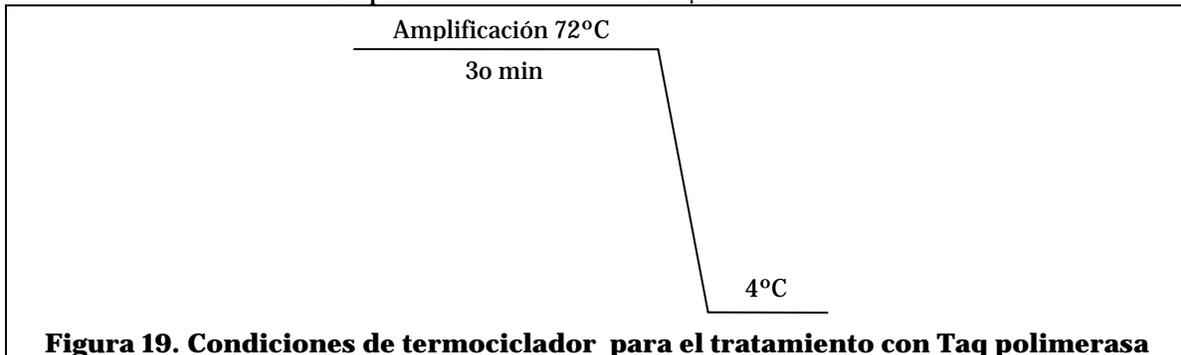


Figura 19. Condiciones de termociclador para el tratamiento con Taq polimerasa

2.3.8 Inserción al plásmido.

La secuencia quimérica se insertó en el plásmido pGEM[®]-T *easy vector* Promega (figura 20), por medio de una reacción de ligación en la cual se utilizó amortiguador de ligación 5 µL, el vector pGEM[®]-T 1 µL, el producto de PCR 1.37 µl y la enzima T4 DNA ligasa 1 µL (pGEM-T and pGEM-T *easy Vector System, Technical Manual No. 042*).

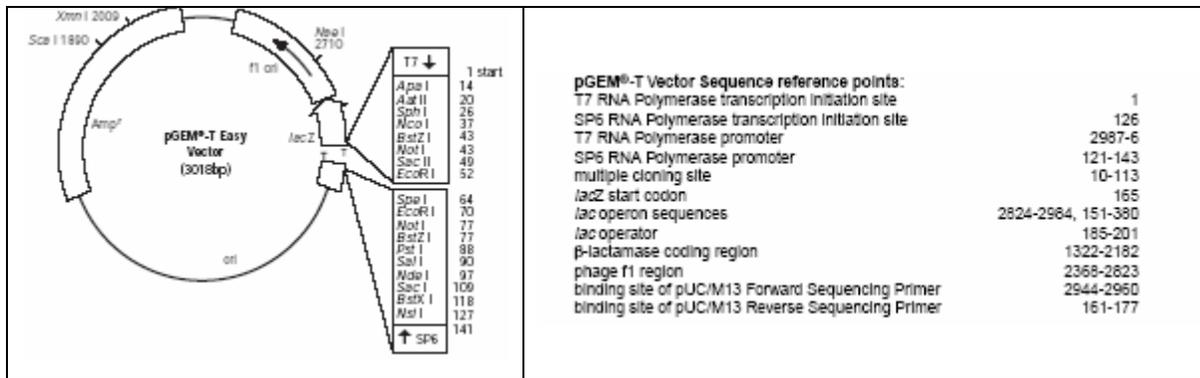


Figura 20 . Vector pGEM-T Easy
se presenta el sitio de clonación y las características del vector según el manual del mismo

Una vez insertado en el vector se transformaron células electro competentes XL1-blue agregando 2 μ l de la ligación a 50 μ l de células a 4°C, se le aplicó un shock eléctrico de 2.5 KV por 5 μ seg inmediatamente después se pasaron a 0.6 mL de medio rico SOC*, se incubó 1 hr a 37°C con agitación. Después de la incubación se sembraron las células en cajas de medio LB* sólido con ampicilina 10 μ g/mL, IPTG 0.5 mM y X-Gal 10 μ g/mL dejándolas crecer durante 12 hrs a 37°C.

De las colonias positivas se aisló el DNA plasmídico y se utilizaron las enzimas de restricción HindIII, EcoRI, para digerir al vector como controles de orientación y tamaño para el inserto mutante.

* ver apéndice del capítulo 3.

3 Expresión de la quimera.

Se transformaron células quimiocompetentes de BL21DE3-pLys con 2 μ l del pGEM-Quimera, se sembraron en cajas de Petri en medio LB* sólido, ampicilina 10 μ g/mL y cloranfenicol 10 μ g/mL.

3.1 Ensayos de Expresión

Se hizo un precultivo de células BL21DE3-pLys transformadas con la secuencia quimérica en 10 mL de medio LB* y ampicilina 10 µg/mL, dejándolo crecer en agitación a 37°C durante toda la noche. Se tomó un 1 mL de este precultivo y se añadió a 6 matraces con 50mL de medio LB* cada uno, se dejó crecer de 5 a 6 hrs hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6 a 600 nm. Se les agregó 0.2, 0.4 y 0.8 mM de IPTG (concentración final). Tres de las muestras inducidas con IPTG se dejaron crecer durante 4 hrs a 37°C con agitación, y las otras tres se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C con agitación. Se tomó 1 mL de cada muestra y se centrifugaron 5 min a 10000rpm, se resuspendieron en vortex. Los 49 mL restantes de cada muestra se centrifugaron 5 min a 10000rpm, se resuspendieron en 7mL de amortiguador de lisis* y se sonicaron 3 pulsos de 1 min por 2 min de descanso, después se centrifugo 15 min a 10000rpm. Todas las muestras resultantes de estos ensayos se sometieron a electroforesis SDS-PAGE al 12%.

3.2 Sobreexpresión de la quimera

Se hizo un precultivo en 50 mL de medio líquido LB de 12 a 16 hrs a 37°C. El precultivo se dividió en partes iguales y cada 25 mL se inocularon en 2 matraces con 800 mL de medio LB más ampicilina 10µg/mL, se dejó crecer de 5 a 6 hrs a 37°C con agitación hasta llegar a una densidad óptica de entre 0.5 y 0.6 a 600nm, en este momento se indujo el cultivo con 0.2 mM de IPTG y se mantuvo a 37°C durante 5 hrs.

4 Purificación de la proteína mutante.

Después de 5 hrs de inducción se centrifugó la muestra durante 10 min a 5000 rpm, se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lysis* pH 6.5. La muestra se sonicó en hielo 10 pulsos de 1 min con 2 min de reposo entre pulso, y se centrifugó por 15 min a 15000 rpm. Posteriormente se centrifugó el sobrenadante a 40,000 rpm durante 45 min, el sobrenadante se precipitó en sulfato de amonio 40% a 4°C dejando en agitación suave de 12 a 16hrs.

Se centrifugó la muestra 15 min a 15000 rpm, el sobrenadante se precipitó en sulfato de amonio 80% y se dejó en agitación suave de 12 a 16 hrs. Transcurrido el tiempo, la muestra se centrifugó 15 min a 15000 rpm y se resuspendió en 2 mL de amortiguador (A*) pH 7.6. Esta muestra se dializó contra amortiguador (A*) a pH 7.6 durante 12 a 16 hrs.

Se realizó una última centrifugación durante 15 min a 15000 rpm antes de pasarla por la columna Sephacryl 300 previamente equilibrada con amortiguador (A*) pH 7.6 durante toda una noche.

Las fracciones resultantes de la cromatografía molecular se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE al 12% de acrilamida donde se detectaron y juntaron aquellas que tenían proteínas del tamaño deseado; este *pool* de fracciones se filtró y se pasaron 3 mL de muestra por la columna mono-Q previamente equilibrada a pH 7.6. La proteína se eluyó con un gradiente de 0 a 100 mM de NaCl incluido en el amortiguador (B*). Durante esta purificación se midió actividad mediante la reacción acoplada tanto al extracto crudo como a las fracciones salientes de la columna.

* ver apéndice del capítulo 3.

5 Determinación de la concentración de proteína

A las fracciones purificadas se les midió la concentración de proteína por la técnica de ácido bicinonínico (BCA), usando sulfato de cobre y albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar y se les midió la absorbancia a 562 nm.

6 Caracterización de la quimera.

Se realizaron ensayos de desnaturalización con clorhidrato de guanidina 6 M y 98 µg/mL de quimera; también se utilizaron dos controles de Tc TIM y Tb TIM a la misma concentración de proteína y desnaturalizante.

6.1 Ensayos de desnaturalización

Las muestras Tb TIM, Tc TIM y la quimera se desnaturalizaron a una concentración de 98 µg/mL a 6 M de guanidina y se incubaron a 25°C durante 36 hrs. Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia a las 24 y 36 hrs, de 300-405nm excitando a 280nm; mientras que las lecturas de intensidad de fluorescencia a 295nm, fueron tomadas de 315 nm a 320 nm.

6.2 Ensayos de renaturalización

Se renaturalizaron las muestras por 24 hrs a 25°C a una concentración final de proteína de 2.5 µg/mL y 0.15 M de guanidina. Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de 300-405nm excitando a 280nm; y las lecturas de intensidad de fluorescencia a 295nm, fueron tomadas de 315nm a 320nm.

6.3 Caracterización por actividad

Para los ensayos de actividad, las enzimas Tc TIM, Tb TIM y la quimera, se desnaturalizaron a una concentración de 98 μ g/mL y 6M de guanidina durante 24hrs a 25°C. Las muestras se renaturalizaron durante 24hrs a 25°C a una concentración final de proteína de 5 μ g/mL y una concentración final de desnaturalizante de 0.03 μ g/mL.

Se midió actividad a las muestras nativas, como también a las muestras renaturalizadas de Tc TIM, Tb TIM y la quimera, mediante el ensayo acoplado de α -GDH 5-10 μ g/ml, NADH 0.2 mM, GAP 1.5-3.0 mM y TIM 5ng/ μ L

Apéndice Capítulo 3

Recetas

Medio LB (Para un litro)

Hidrolizado de Caseína	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	9g
Na ₂ HPO ₄	1g

Medio SOC

Bacto triptona	2g
Extracto de Levadura	0.5g
NaCl	1ml
KCl	0.25ml
Mg ²⁺	1ml
Glucosa 2M	1ml

Amortiguador de lisis

MES	25mM
DTT	1mM
EDTA	1mM
PMSF	0.2mM

Amortiguador A

TEA	50mM
DTT	1mM
EDTA	1mM
Azida de sodio	1mM

Amortiguador B

TEA	50mM
DTT	1mM
EDTA	1mM
Azida de sodio	1mM
NaCl	200mM

Amortiguador de reacción 10x (PCR)

KCl	10mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10mM
Tris-HCl	20mM
Triton X-100	0.1%
MgSO ₄	2.0mM

Capítulo 4

Resultados y Discusión

1 Construcción de la proteína E110-E168.

Al realizar los ensayos de PCR descritos en el capítulo anterior se obtuvieron los siguientes resultados.

1.1 PCR1

Al amplificar la región central de Tc TIM se utilizaron los oligonucleótidos Fw100 y Rev 170 (**2.3.1** material y métodos). Resultando un fragmento de 220pb (tabla 5 columna 1). Este fragmento comprende entre los aminoácidos: Ácido glutámico (Glu) 110 y el ácido glutámico(Glu) 168 (figura 21).

1.2 PCR 2 y PCR 2.1

Se utilizó el fragmento anterior y el oligonucleótido T7-*promoter* sobre el gen de Tb TIM, para amplificar el fragmento amino terminal de Tb TIM (2.3.2 material y métodos), de la Metionina (M) 1 a la Alanina (A) 109 (tabla 5 columna 2). Al unirlo con la región central de Tc TIM (2.3.3 material y métodos) se obtuvo un fragmento de 610 pb (tabla 4 columna 3), que se encuentra entre la Metionina 1 y el ácido glutámico (Glu) 168 (figura 21).

1.3 PCR 3

La región carboxilo terminal de Tb TIM se obtuvo a partir del gen de Tb TIM con los cebadores Fw180Tc-3 y BamHI Tb (2.3.4 material y métodos) con un tamaño de 586pb (tabla 5 columna 4) que comprende entre la prolina (P) 169 y la cisteina (Q) 250 (figura 21).

1.4 PCR 4 y PCR 4.1

El fragmento anterior se acopló al fragmento de 610pb por hibridación (tabla 5 columna 5) sin utilizar ningún primer (2.3.5 material y métodos); el rendimiento de esta reacción no es exponencial por lo que sólo se alcanza a duplicar o triplicar el templado. Se requirió un segundo PCR (2.3.6 material y métodos), para optimizar el rendimiento de manera exponencial, adicionándole los oligonucleotidos T7-*promoter* y Bam HI Tb (tabla 5 columna 6), para reamplificar de inicio a fin la secuencia quimérica de 1100 pb, y así es como se obtuvo la construcción completa (Figura 21).

PCR*	Región	Templado**	Oligos utilizados	Tamaño pb
1	central	Tc	Fw100 y Rev 170	220
2	Amino terminal	Tb	Region central y T7 prom	390
2.1	amino terminal/central	Tb/Tc	T7 prom y Rev 170	610
3	carboxilo terminal	Tb	Fw180 Tc-3 y Bam HI Tb	586
4	Toda	Tb/Tc/tb	sin oligos	1100
4.1	Toda	Tb/Tc/tb	T7 prom y Bam HI Tb	1100

Tabla5. fragmentos obtenidos de cada ensayo de PCR.

*Todos los ensayos de PCR se realizaron con Pfu polimerasa **DNA molde de donde se obtuvo cada fragmento.

Para comprobar que se produjeron los fragmentos de los tamaños correspondientes a cada PCR (Tabla 5), se corrieron electroforesis en geles de agarosa al 1% donde se constatan los pesos en bandas mayoritarias en cada ensayo, (figura 21.)

1.5 Tratamiento con Taq DNA polimerasa.

Para la construcción de la quimera se utilizó Pfu polimerasa, ésta enzima tiene la característica de auto corrección además de la de polimerizar el DNA, es decir, es una polimerasa 5'-3' con actividad de exonucleasa 3', que no agrega adeninas "A" al final de la secuencia

polimerizada, las cuales son necesarias para insertar en el vector de clonación. Por lo que se le dio un tratamiento con Taq DNA polimerasa (2.3.7 material y métodos) la cual agregó las bases al final de la secuencia.

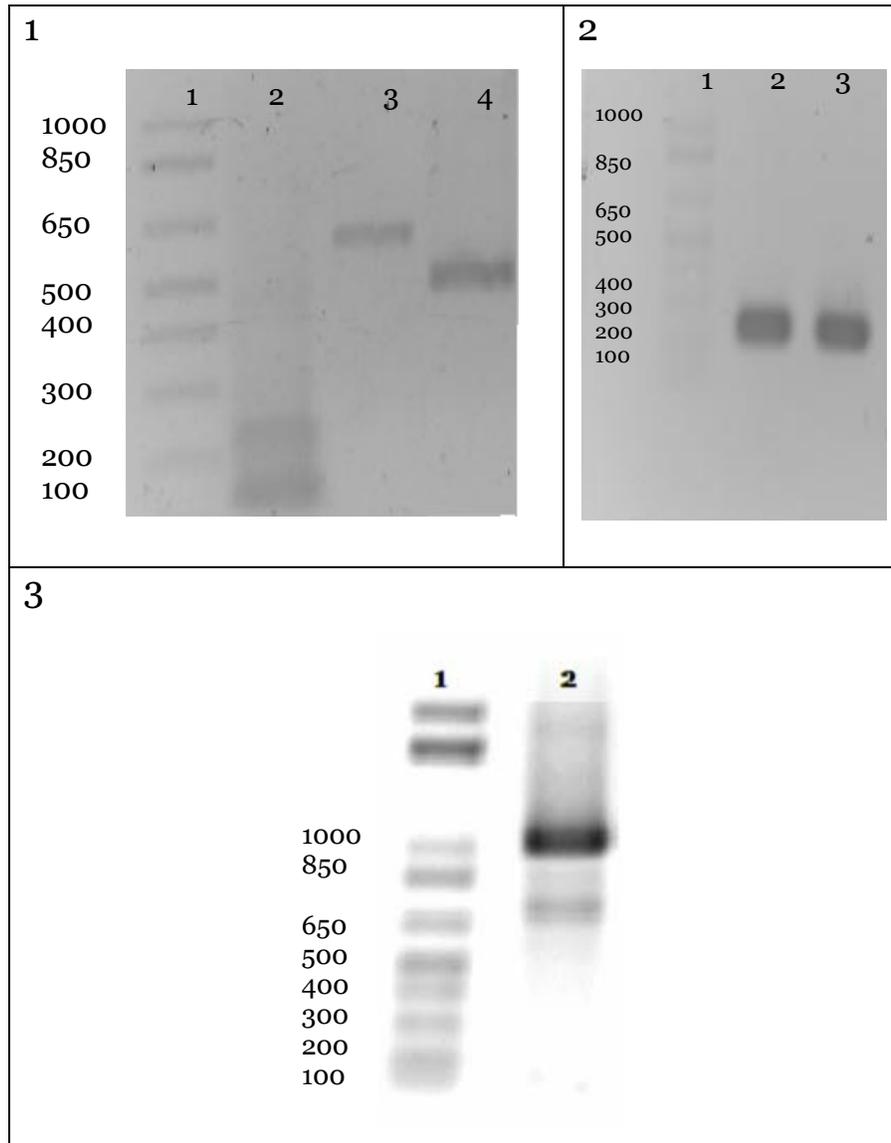


Fig 21. Fotos de los geles de agarosa al 1%
1) carril 1: marcador de peso molecular; carril2: fragmento de la región central de Tc TIM 220 pb sin purificar. Carril3: fragmento de la unión del amino terminal de Tb TIM y la región central de Tc TIM 610 pb purificado. Carril4: región carboxilo terminal de Tb 586 pb purificado. **2)** carril 1: marcador de peso molecular; carril2: fragmento de la región central de Tc TIM 220 pb purificado. Carril3: fragmento de la región central de Tc TIM 220 pb purificado. **3)** carril 1: marcador de peso molecular; carril2: Quimera completa 1100 pb. En todos los geles se utilizo el marcador de peso molecular 1Kbase plus.

1.6 Inserción al plásmido

El gen de la quimera se clonó en el vector pGEM-T *easy vector*, para verificar la presencia de inserto, el plásmido se linearizó (2.3.8 material y métodos). El tamaño del vector es de 3000 pb y el tamaño de la construcción es de 1100 pb, al ligarlos y correr la muestra en gel de agarosa al 1%, se obtuvo una banda muy bien definida de 4100 pb (figura 22), lo que demuestra que se logró introducir el gen construido experimentalmente dentro del plásmido.

1.7 Digestión con enzimas de restricción

Para tener la certeza que la construcción experimental coincide en tamaño y secuencia con el diseño teórico se analizó con las siguientes enzimas de restricción (tabla 6.)

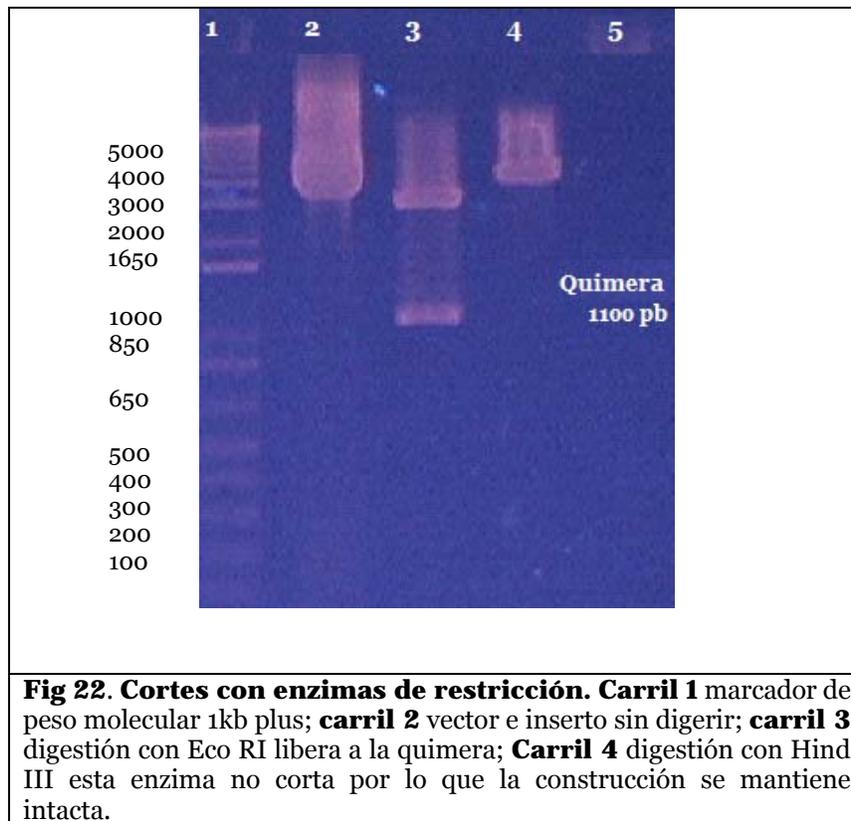
HindIII (figura 22.): El corte con esta enzima nos permite saber si la clonación fue exitosa, debido a que en la secuencia de Tc TIM solo hay un sitio de corte dentro de la región central, de la base 460-464, y se encuentra dentro de la secuencia de la quimera. También nos dice si la construcción que se realizó no fue Tb TIM ya que no corta en ésta secuencia (tabla 6).

EcoRI (figura 22): El corte con esta enzima nos dice el tamaño del inserto y si se clonó, ya que esta enzima corta al plásmido al principio y al final del sitio de inserción liberando a la quimera, también nos dice si no es Tc TIM ya que la secuencia de Tc es de 900 pb (tabla 6).

Enzima	pGEM-Tb	pGEM-Tc	pGEM-Quimera
Hind III	No corta	4100	4100
Eco RI	1100+3000	900+3000	1100+3000

Tabla 6. Digestión con enzimas de restricción.

Se muestran el tamaño de los fragmentos digeridos según el corte con cada enzima. Los tamaños están en pares de bases (pb)



Al realizar estos controles se verificó que la químera está en la dirección correcta es decir bajo el promotor de T7. Presenta el tamaño adecuado de la construcción teórica de 1100 pb y una vez insertada en el vector tiene un tamaño de 4100 pb teniendo satisfactoriamente la construcción dentro del plásmido.

1.8 Discusión general de la construcción

La construcción de la químera llevó un proceso largo y se realizaron muchas pruebas antes de poder obtener de manera satisfactoria dicha proteína, para obtener cada fragmento por PCR se probaron muchas condiciones, en particular se utilizaron varios oligonucleótidos ya que algunos de éstos no lograron amplificar los fragmentos. El paso más

complicado fue la unión de la región amino terminal de Tb TIM con la región central de Tc TIM pues el diseño original indicaba que deberían pegar por acoplamiento exactamente en las regiones de corte, pero este diseño no dio ningún resultado, por lo que se recorrió el corte de la región amino hacia el carboxilo terminal y con este pequeño recorrido, de alrededor de 20 bases fue suficiente para que por hibridación se lograra amplificar a la quimera. La unión de los demás fragmentos no tuvo mayor problema. Los problemas presentados en la unión de la región amino terminal de Tb TIM con la región central de Tc TIM, pudieron ser debidos a la degradación del extremo de los fragmentos de estas dos regiones por alguna contaminación en alguno de los componentes utilizados para dicha unión, o a un error en la síntesis de los oligonucleótidos.

Para la construcción final se manipuló con mayor precaución todos los componentes de la reacción de PCR, almacenándolos a -20°C , utilizando alícuotas nuevas de cada uno y mandando a sintetizar nuevos oligonucleótidos, también el manejo de la pipeta al cargar la reacción se realizó con más cuidado, evitando contaminaciones.

2 Secuencia de la quimera

Se mandó secuenciar el plásmido con el inserto y se comprobó que la secuencia corresponde al diseño que se realizó.

Se obtuvo una secuencia con el amino terminal de Tb TIM hasta el aminoácido A 109, la región central de Tc TIM del aminoácido E 110 al E 168, y el carboxilo terminal de Tb TIM del aminoácido P 169 al final de la secuencia (tabla 7). Destacando que después del codón de término hay una región que no afecta a la misma, pero este fragmento de

alrededor de 250 pb de bases existe y hay que considerarlo para futuras construcciones a realizar a partir de la que se presenta en este trabajo. También se comprobó que al traducir esta secuencia a aminoácidos no presenta mutaciones no deseadas. Esto quiere decir que solo existen las mutaciones por regiones que se presentan en el diseño teórico, lo cual es gracias a que se utilizó una DNA polimerasa con la capacidad de auto corrección.

<i>Tb TIM</i>	-MSKPQPIAAANW <u>K</u> CNGSQQLSELIIDLFNSTSI ^H NHDVQCVVASTFVHLAMTKERLSHPK 59
<i>Quimera</i>	MSKPQPIAAANW <u>K</u> CNGSQQLSELIIDLFNSTSI ^H NHDVQCVVASTFVHLAMTKERLSHPK 59
<i>Tc TIM</i>	MASKPQPIAAANW <u>K</u> CNGSESLLVPLIETLNAATFDHDVQCVVAPTFLHIPMTKARLTNPK 60
<i>Tb TIM</i>	FVIAAQNAIAKSGAFTGEVSLPILKDFGVNWIVLGH ^H SERRAYYGETNEIVADKVA ^A AVAS 119
<i>Quimera</i>	FVIAAQNAIAKSGAFTGEVSLPILKDFGVNWIVLGH ^H SERRAYYGETNEIVA ^E KVAQACAA 119
<i>Tc TIM</i>	FQIAAQNAITRSGAFTGEVSLQILKDYGISWVVLGH ^H SERRLYYGETNEIVA ^E KVAQACAA 120
<i>Tb TIM</i>	GFMVIACIGETLQERESGRTAVVVL ^T QIAAIAK ^L LK ^K KADWAKVVIAYE ^E PVWAIGTGK ^V AT 179
<i>Quimera</i>	^G FHVIVCVGETNEEREAGRTAAVVL ^T QLAAVAQ ^L KSKEAWSRVVIAYE ^E PVWAIGTGK ^V AT 179
<i>Tc TIM</i>	G ^F HVIVCVGETNEEREAGRTAAVVL ^T QLAAVAQ ^L KSKEAWSRVVIAYE ^E PVWAIGTGK ^V AT 180
<i>Tb TIM</i>	PQQAQE ^A HALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGGASL ^K 239
<i>Quimera</i>	PQQAQE ^A HALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGGASL ^K 239
<i>Tc TIM</i>	PQQAQE ^V HELLRRWVRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDINGFLVGGASL ^K 240
<i>Tb TIM</i>	PEFVDI ^I KATQ- 250
<i>Quimera</i>	PEFVDI ^I KATQ- 250
<i>Tc TIM</i>	PEFVEI ^I EATK- 251

Tabla 7. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Tb TIM, quimera y Tc TIM. Sombreado el cambio que se realizó de la región central. Sombreado los aminoácidos catalíticos.

3 Expresión de la quimera

Después de realizar los ensayos de expresión se demostró que no hay variación en la cantidad de proteína expresada a 0.2, 0.4 y 0.8 mM de IPTG (figura 23). Pero la cantidad de proteína expresada sí varía con el tiempo, ya que si el cultivo se deja crecer 12 hrs, se observa menos proteína, esto puede ser debido a su degradación, para su posterior reutilización por la bacteria. Se determinó que con 5 hrs de inducción con IPTG es suficiente para tener la cantidad necesaria de proteína.

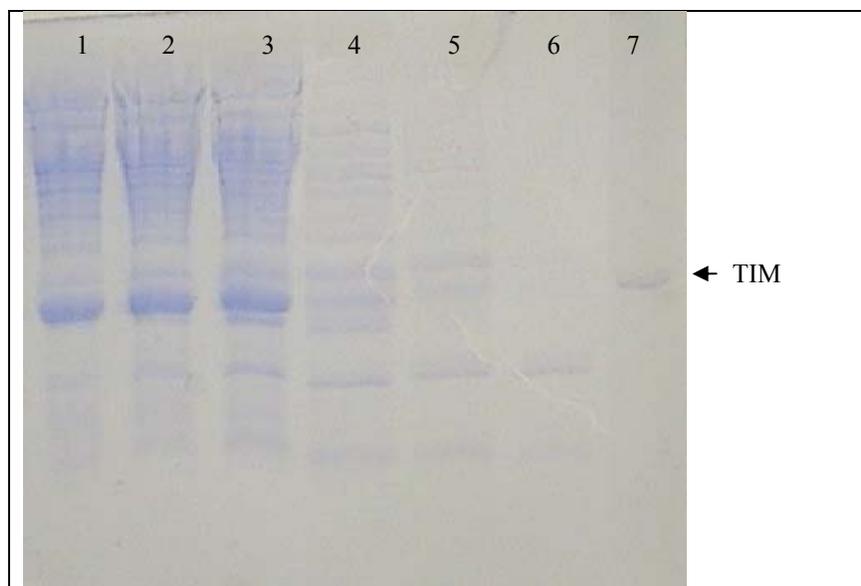


Fig 23. Ensayos de expresión

Del carril 1 al 3 se utilizó 0.2mM, 0.4 mM y 0.8 mM de IPTG y cuatro horas de inducción respectivamente. Del carril 4 al 6 se utilizó 0.2mM, 0.4 mM y 0.8 mM de IPTG y 12 hrs de inducción respectivamente

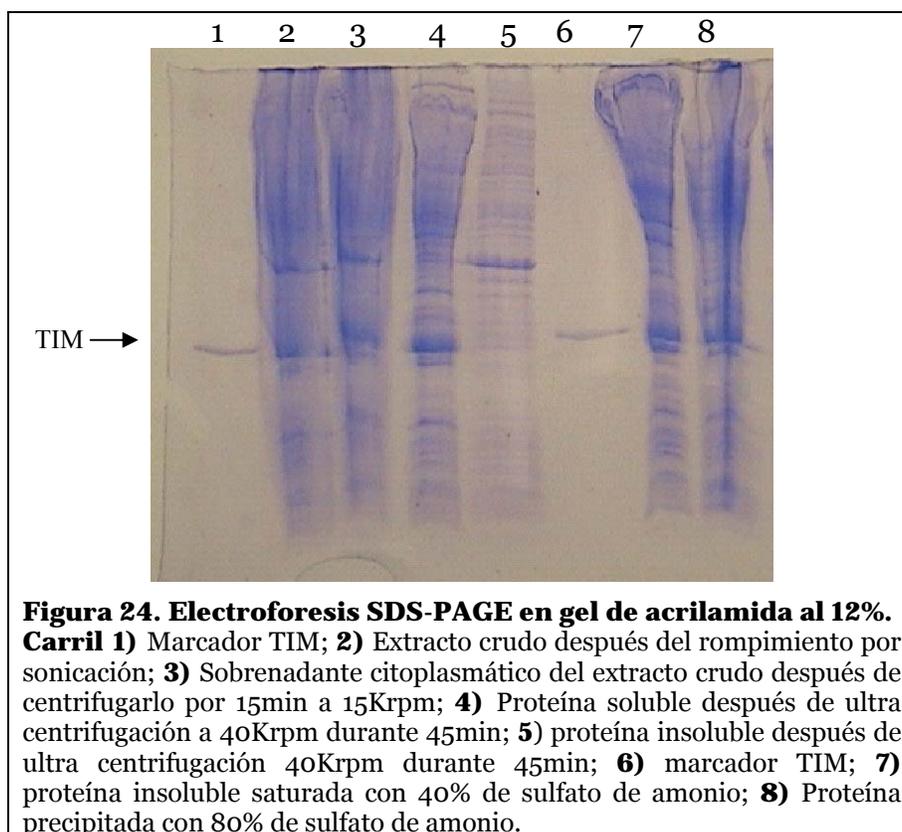
3.1 Sobreexpresión

La sobre expresión de la proteína se llevó acabo con el plásmido pGEM-T que, aunque no es un vector de expresión, se pudo utilizar ya que dentro de la construcción se incluye el sitio de unión a ribosoma; este le permite al ribosoma anclarse y comenzar la traducción. Por otro lado, el vector tiene un promotor flanqueando el sitio de clonación, y en la construcción antes del codón de inicio se incluye un sitio de unión de ribosoma. La proteína se sobreexpresó en células de *E. coli* BL21/DE3-pLys. Estas células expresan la polimerasa de T7 al agregar IPTG por lo cual sobreexpresan la quimera (figura 24 carril 2).

4 Purificación

Las células se lisaron sonicando la muestra entre 8 y 10 pulsos de 1min. La proteína se localizó mayoritariamente en el extracto citoplasmático

(Figura 24 carril 3), no se encontró asociada a membranas, lo que indica que esta proteína en particular se mantiene en estado soluble durante sus primeras etapas de purificación. La proteína se precipitó con sulfato de amonio del 40 al 80%(Figura 24 carril 7 y 8 respectivamente).



Al pasar el precipitado de sulfato de amonio por la columna de filtración molecular *Sephacryl* 300 se observa presencia de TIM dentro de 16 fracciones de la 40 a la 56, pero sólo se tomaron 46, 47 y 48 (*pool* A) y 49, 50 y 51 (*pool* B) siguiendo la purificación con el *pool* A, al presentar menor cantidad de proteína diferente a TIM siendo así más adecuado para los siguientes pasos de purificación (figura25.) A estas dos fracciones se les midió la actividad para verificar que efectivamente las bandas correspondan a TIM.

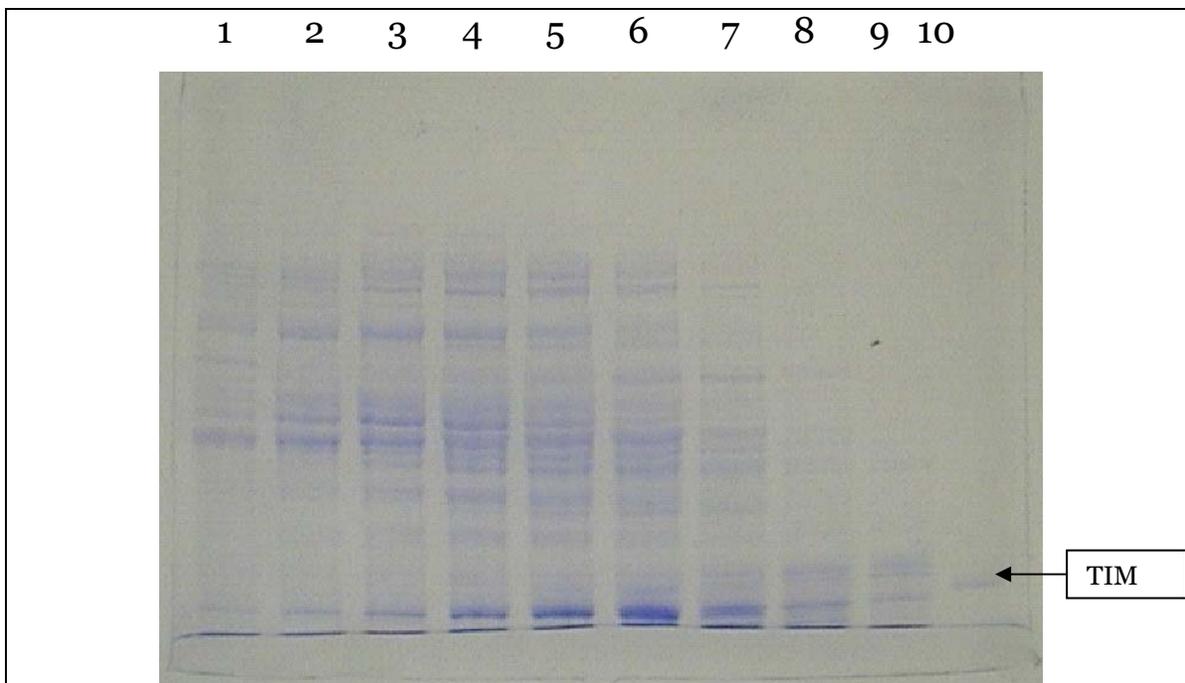


Fig 25. Electroforesis SDS-PAGE en gel de acrilamida al 10%. Sephacryl 300

Carril 1: fracción 40, carril 2: fracción 42, carril 3: fracción 44, carril 4: fracción 46, carril 5: fracción 48, carril 6: fracción 50, carril 7: fracción 52, carril 8: fracción 54, carril 9: fracción 56, Carril 1 al 9 fracciones que presentan tamaño semejante a TIM al pasar el extracto crudo por la columna de exclusión molecular; carril 10 marcador de peso molecular TIM.

Se pasó la muestra A por la columna Mono Q a pH 7.6 donde se detectan varias bandas que coinciden con el marcador TIM (Figura 26). Se midió actividad a las fracciones 5, 6, 50,51 ,52. La fracción 5 es la única que cumple con las características de pureza y actividad (Tabla 8), por lo que se utilizó para los ensayos de desnaturalización y actividad, Esta fracción fue obtenida con 100 mM de NaCl en el gradiente aplicado a la columna.

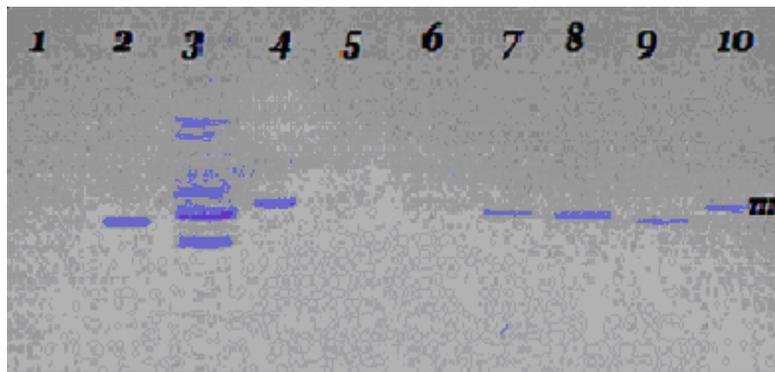


Fig 26. Electroforesis en gel de acrilamida 12% mono Q 7.6.

Carril 1 fracción 4, **carril 2** fracción 5, **carril 3** fracción 6, **carril 4** marcador TIM, **carril 5** fracción 48, **carril 6** fracción 49, **carril 7** fracción 50, **carril 8** fracción 51, **carril 9** fracción 52, **carril 10** marcador TIM.

Fracción	Actividad	OD ₂₈₀ 1:10	Estado
5	0.0318	0.016	Pura y Activa
6	0.1804	0.022	Impura y Activa
50	No presenta	No se midió	Pura e inactiva
51	No presenta	No se midió	Pura e inactiva
52	No presenta	No se midió	Pura e inactiva

Tabla 8. Resultado de la medición de actividad por reacción acoplada de las fracciones de la columna mono Q.

Comentarios sobre la columna de intercambio iónico

Se probó purificar esta proteína según los métodos reportada para Tb TIM (Borchert et al., 1992) y Tc TIM (Ostoa-Soalma et al., 1997) pero al ir avanzando dentro de la purificación, según estos dos protocolos no se obtuvo ningún resultado concreto de la purificación, hasta después de pasarla por la columna de exclusión molecular *Sephacryl* 300, se probó la purificación con la columna Mono Q se logró purificar de manera satisfactoria la proteína. Los protocolos de purificación de Tb y Tc TIM utilizaban una columna Carboximetil (CM) que al igual que la mono Q es de intercambio iónico, sin embargo la mono Q es de intercambio aniónico y la CM es de intercambio catiónico.

5 Concentración de proteína

Para los siguientes experimentos es necesario conocer con exactitud la concentración de proteína, la cual se midió por el método de BCA realizando una curva patrón donde se encontró que la concentración de la muestra de proteína quimérica es de 392 µg/ml.

6 Caracterización de la proteína

Se obtuvieron los datos de actividad específica para Tb TIM, Tc TIM y La quimera mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad específica } (\mu \text{ mol} / \text{min} * \text{mg}) = \frac{\frac{\Delta \text{ u.a.}}{\text{mL}}}{\frac{6.22 \text{ u.a.}}{\mu \text{ Mol}} * [\text{Protéina}(\text{mg}/\text{mL})]}$$

Donde Δ u.a. es el cambio en la pendiente de las unidades de absorbancia a 340nm, 6.22 u.a. es el coeficiente de extinción de el NADH.

La quimera presenta el 25.81% de actividad específica al compararla con Tb TIM. Al comparar la quimera contra Tc TIM tenemos que tiene 24.9% de actividad específica (Tabla 9).

	Actividad específica (µ mol / min* mg)	% de AE		Actividad específica (µ mol / min* mg)	% de AE
Tb nativa	1881.02	100	Tc nativa	1948.55	100
Quimera nativa	485.53	25.81	Quimera nativa	485.53	24.91

Tabla 9 caracterización de la quimera.

Actividad específica de la Tb TIM, Tc TIM y la quimera y el porcentaje de actividad específica para la quimera tomado como 100% a la actividad específica de Tb TIM y Tc TIM.

6.1 Ensayos de desnaturalización.

La proteína se desnaturalizó por un periodo de 36 hrs de incubación a 25°C, 6M de guanidina y 98 µg/mL. Se tomaron las lecturas excitando

a 280 nm y 295 nm a 24 y 36 horas de incubación (Figura 27). En las gráficas se puede apreciar la migración del estado nativo al estado desnaturalizado (tabla 10).

Para obtener el centro de masa espectral (SCM) se utilizo la siguiente ecuación:

$$SCM = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)}$$

Donde $I(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda λ .

	λ max 280	SCM 280	λ max 295	SCM 295
Quimera nativa	327.125	336.693961	328.125	348.9666457
Quimera desnaturalizada 24h	311.375	337.0808905	329.875	356.4838282
Quimera desnaturalizada 36h	343.75	349.7860917	345.625	357.2054549

Tabla 10.Desnaturalización de la quimera.

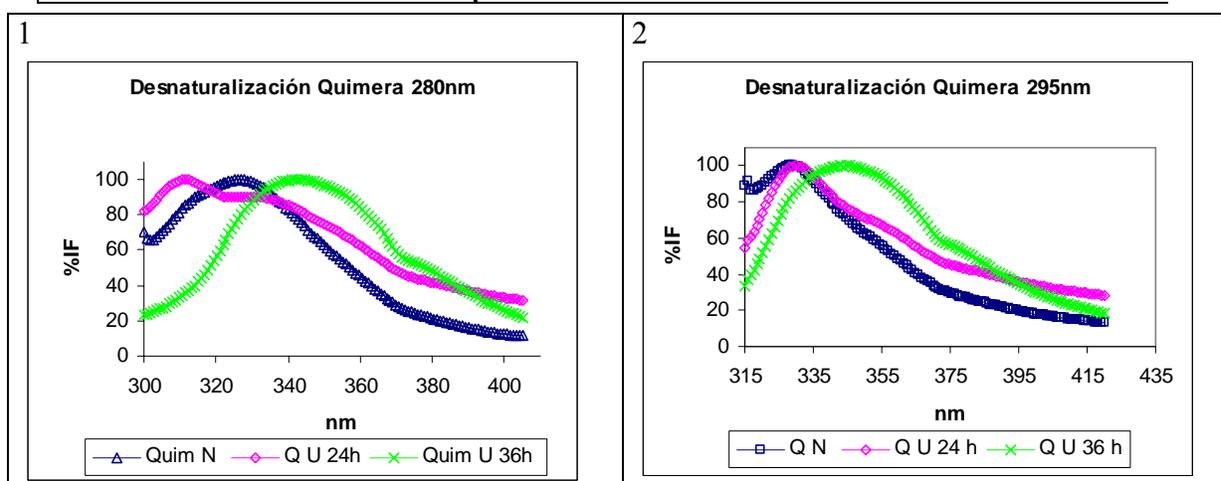


Figura 27. Desnaturalización de la quimera.

1. Porcentaje de intensidad de fluorescencia excitando a 280nm al desnaturalizar la proteína.

2. Porcentaje de intensidad de fluorescencia excitando a 295nm al desnaturalizar la proteína. Quimera nativa en azul, quimera desnaturalizada 24 horas a 25°C en rosa y en verde quimera desnaturalizada 36 horas a 25°C. Los datos se normalizaron.

6.2 Renaturalización Tc TIM Tb TIM y quimera.

Al desnaturalizar las proteínas con 6M de guanidina, perdieron la estructura tridimensional y por lo tanto la actividad biológica. Al diluir el desnaturalizante y llevarlo a una concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.15 mM de guanidina, las proteínas se renaturalizaron arrojando los siguientes datos: Al seguir la desnaturalización y renaturalización de Tc TIM tenemos que esta proteína recupera el 97 % de estructura,

tomando el promedio de los datos de λ max y de SCM excitando 280 y 295 nm (figura 28 tabla 12). Por otro lado al realizar los mismos ensayos de renaturalización a la enzima de Tb vemos que esta recupera un 64% de estructura tomando el promedio de los datos de λ max y de SCM excitando 280 y 295nm (figura 29 tabla 13). Por último se tomaron los datos a la quimera, éstos nos dicen que recupera el 91% según el promedio de λ max y de SCM excitando 280 y 295nm (figura 30 tabla 14).

Para obtener el porcentaje de renaturalización se utilizo la siguiente ecuación:

$$\% R = (Y_U - Y_R) 100 / (Y_U - Y_N)$$

Donde Y_U son los valores de la especie desnaturalizada, Y_R son los valores de la especie renaturalizada y Y_N son los valores de la especie nativa.

Los datos de actividad muestran que la proteína de Tc recupera el 100% la actividad inicial, Tb recupera el 65%, mientras que la quimera renaturalizada solo el 25% de actividad con respecto de la quimera nativa. (Tabla 11).

	Actividad Especifica (μ mol / min*mg)	Actividad normalizada vs TcTIM Nativa.
Tc nativa	1948.55	100
Tc renaturalizada	1964.63	100.8
Quimera nativa	485.53	25
		Actividad normalizada vs TbTIM Nativa.
Tb nativa	1881.02	100
Tb renaturalizada	1228.29	65.2
Quimera nativa	485.53	25.8
		Actividad normalizada vs Quimera Nativa.
Quimera nativa	485.53	100
Quimera renaturalizada	122.18	25

Tabla 11. Actividad de Tc TIM y Tb TIM y TIM mutante E110-E168.

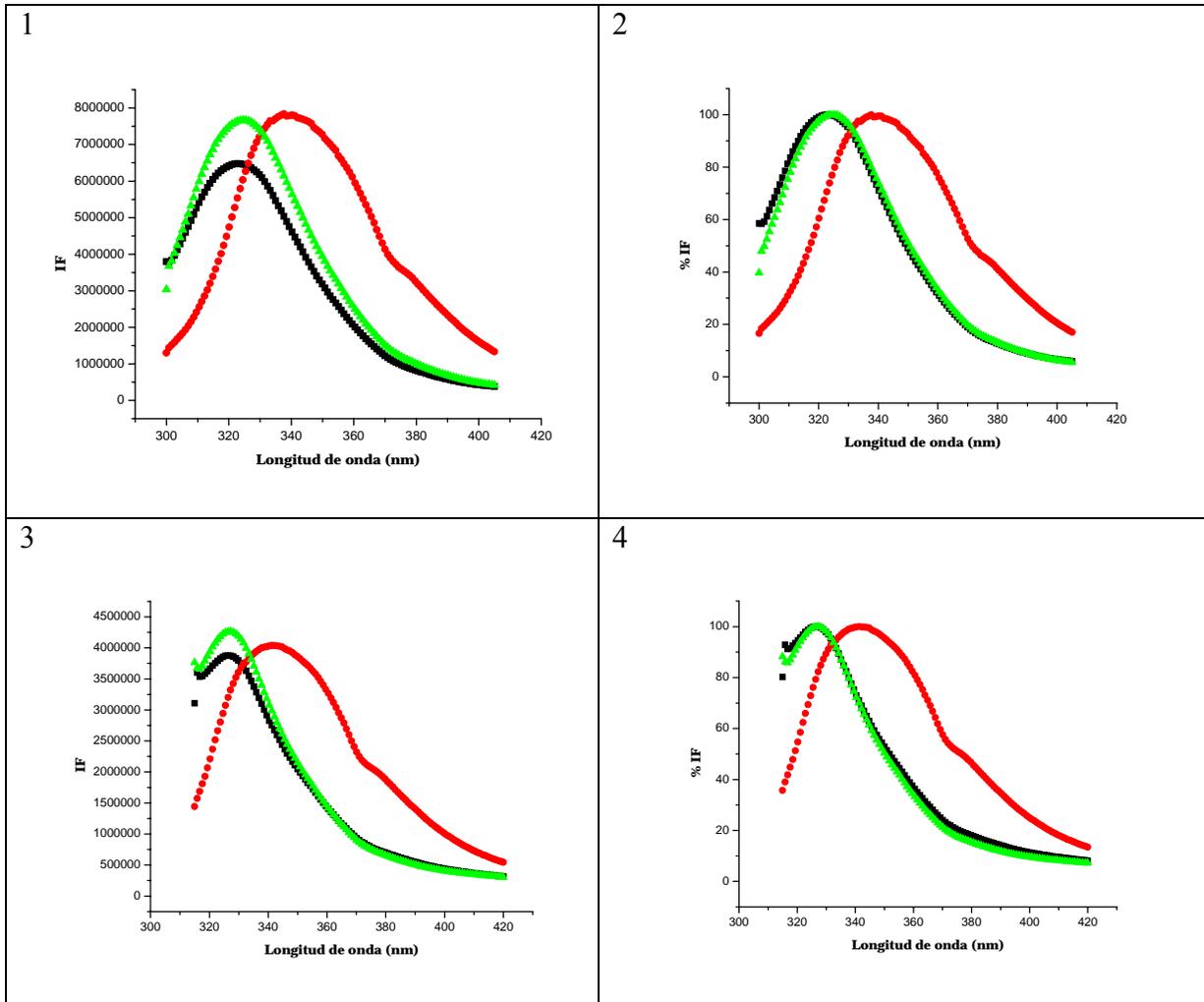


Fig 28. Espectros de fluorescencia Comparación Tc TIM.

1. Datos sin normalizar a 280 nm. 2. Datos normalizados 280 nm. 3. Datos sin normalizar a 295 nm. 4. Datos normalizados a 295 nm. ■ TcTIM nativa ●Tc TIM desnaturalizada. ▲ Tc TIM renaturalizada.

	λ max 280	SCM 280	λ max 295	SCM 295	%Renaturalización total
Tc TIM nativa	322.75	332.96	326.375	344.85	
Tc TIM desnaturalizada	337.625	348.21	341.25	355.22	
Tc TIM renaturalizada	324.5	333.84	327.25	343.65	
% renaturalización	88.23	94.22	94.11	111.57	97.03

Tabla12. Tc TIM

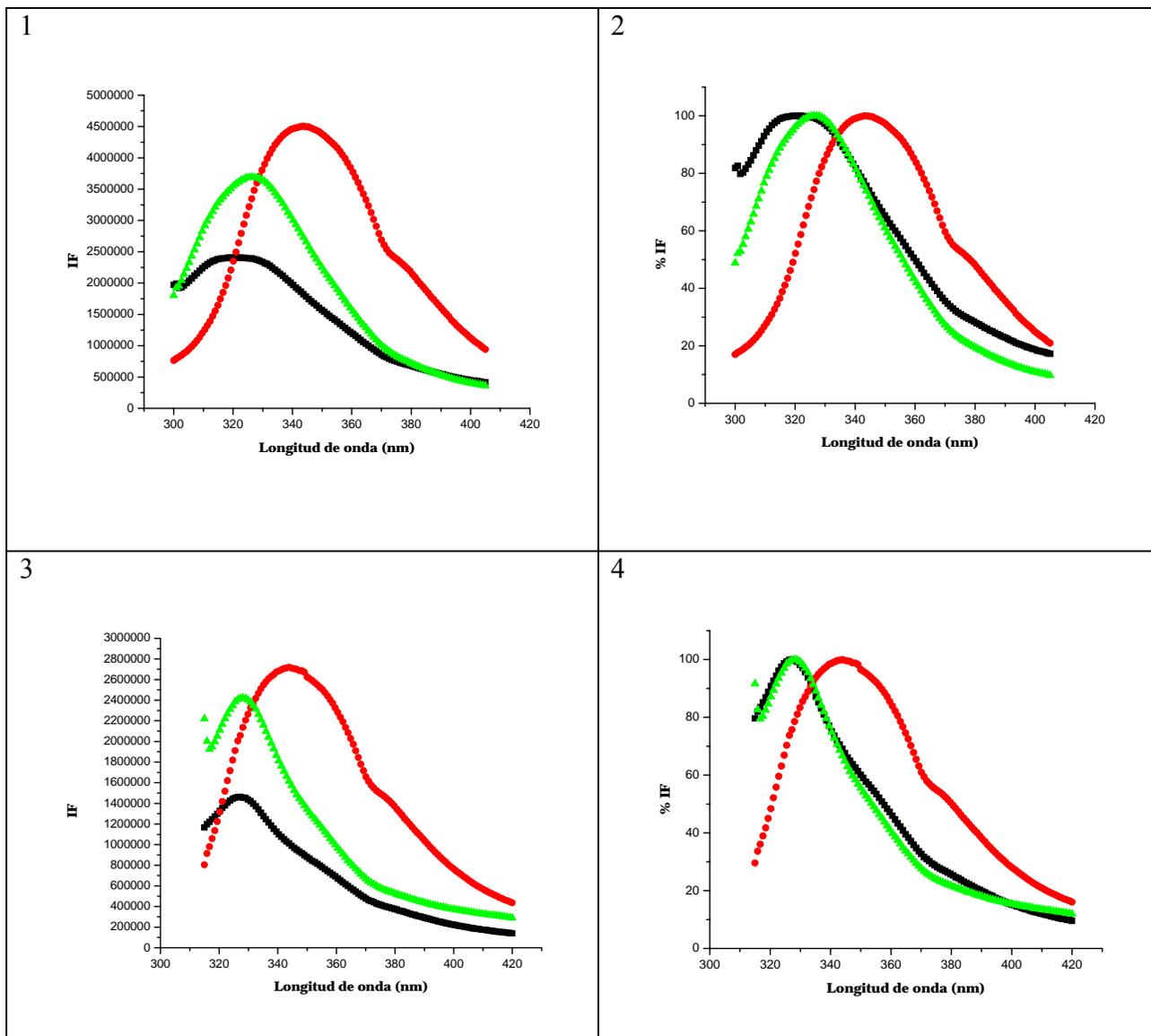


Fig 29. Espectros de fluorescencia Comparación Tb TIM.

1. Datos sin normalizar a 280 nm. 2. Datos normalizados 280 nm. 3. Datos sin normalizar a 295 nm. 4. Datos normalizados a 295 nm. ■ Tb TIM Nativa. ● Tb TIM desnaturalizada ▲ Tb TIM renaturalizada.

	λ max 280	SCM 280	λ max 295	SCM 295	%Renaturalización total
Tb TIM nativa	321.875	418.82	327.25	347.88	
Tb TIM desnaturalizada	343.75	350.64	343.875	356.91	
Tb TIM renaturalizada	326.25	336.65	328.125	347.51	
% renaturalización	80	-20.5192138	94.7368421	104.097453	64.5787703

Tabla 13. Tb TIM

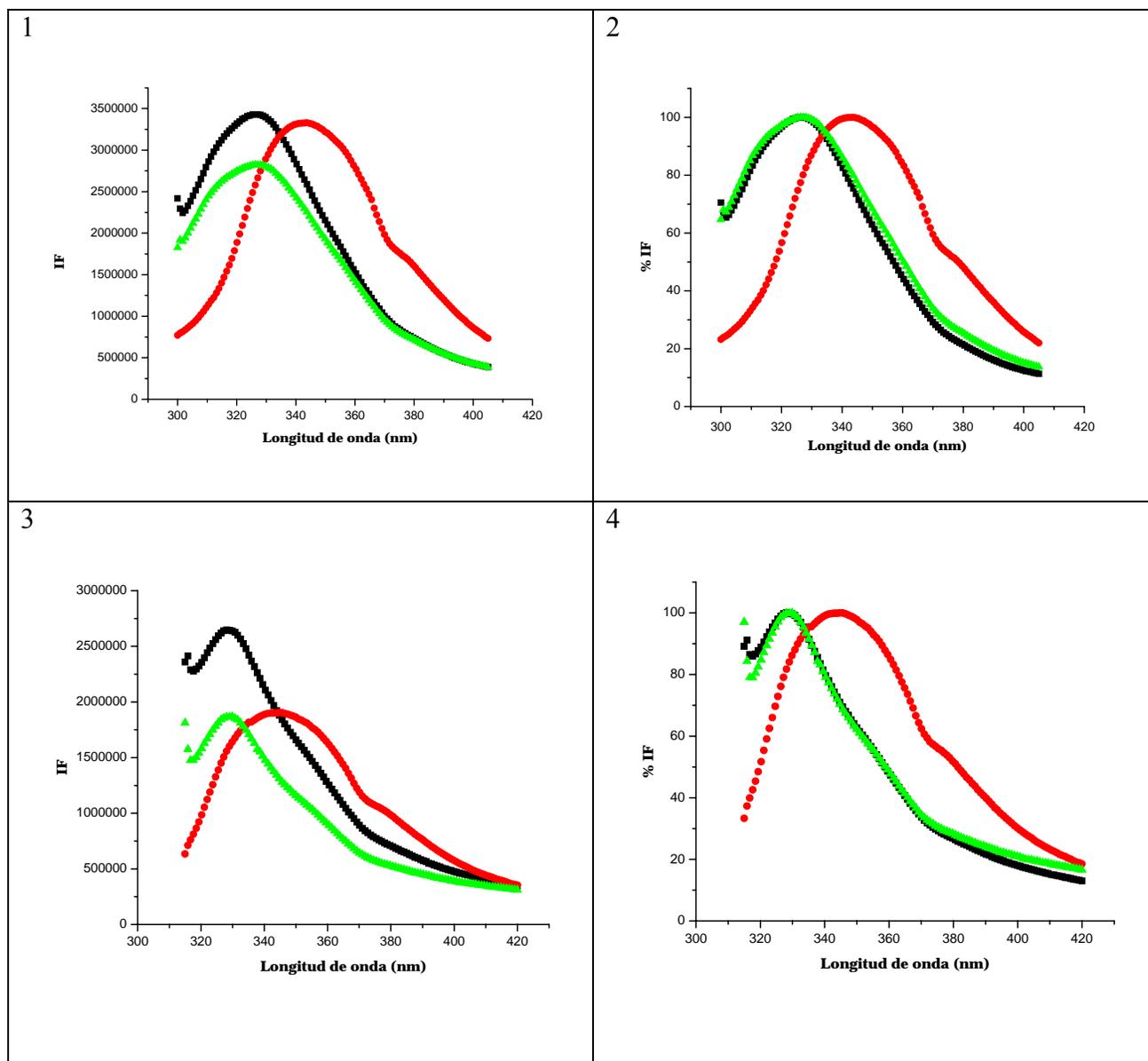


Fig 30. Espectros de fluorescencia, Comparación quimera.

1. Datos sin normalizar a 280 nm. 2. Datos normalizados 280 nm. 3. Datos sin normalizar a 295 nm.
4. Datos normalizados a 295 nm. ■ Quimera Nativa. ● Quimera desnaturalizada. ▲ Quimera renaturalizada.

	λ max 280	SCM 280	λ max 295	SCM 295	%Renaturalización total
Quimera nativa	327.125	336.69	328.125	348.96	
Quimera desnaturalizada	343.75	349.78	345.625	357.2	
Quimera renaturalizada	326.25	337.95	329.875	350.42	
% renaturalización	105.26	90.37	90	82.28	91.97

Tabla14. Quimera

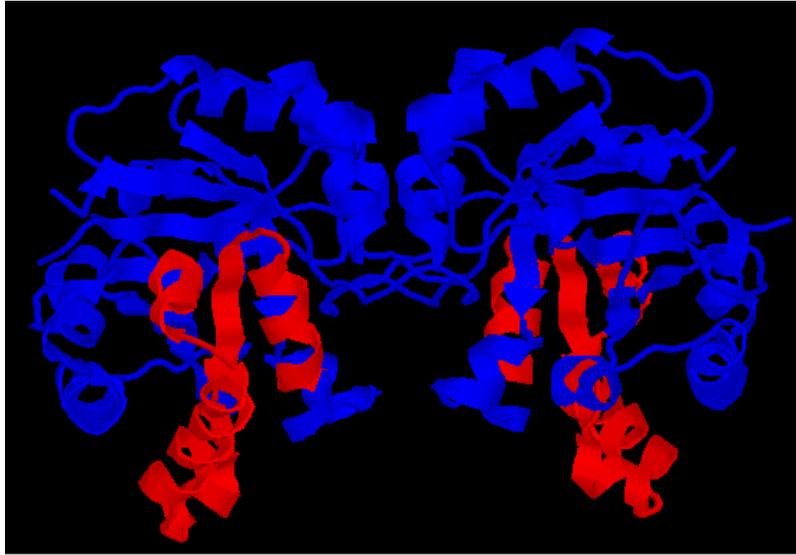
Al desnaturalizar y renaturalizar la proteína quimérica se obtiene el 91% de la fluorescencia de la enzima nativa pero modifica la actividad biológica recuperándose solo el 25%.

Lo anterior nos indica la posición de los fluoróforos intrínsecos, pero no nos dice que pasa para toda la estructura, ya que esta se ve modificada al no recuperar la actividad. Como reporta anteriormente (Chávez-Cárdenas et al., 2005) para el caso de Tc se recupera la estructura y la actividad, para el caso de Tb (Chávez-Cárdenaz ME et al., 2002) no recupera ninguna de las dos, por la formación de agregados.

El papel de la región central dentro del plegamiento

La construcción quimérica, adquiere con el cambio en la región central algunas características de Tc TIM, ya que al comparar los espectros y los datos de la renaturalización seguida por fluorescencia intrínseca de las tres enzimas, se asemeja más al comportamiento presentado por Tc TIM que a Tb TIM, pero al comparar los datos de actividad la quimera presenta una renaturalización más parecida a Tb TIM por lo que el cambio en esta región permite la recuperación en la posición de los fluoróforos intrínsecos pero no la recuperación completa de la estructura modificando la actividad biológica (figura 31). No tenemos la evidencia suficiente para descifrar por completo esto, pero no hay evidencia de que se formen agregados durante la renaturalización, esto sugiere que se avanza en la dirección correcta hacia la renaturalización de Tb TIM pero es necesario realizar más estudios para poder lograr entender bien el papel que tiene esta región dentro de el plegamiento. Por lo anterior se considera a la quimera una proteína no reversible.

1



2

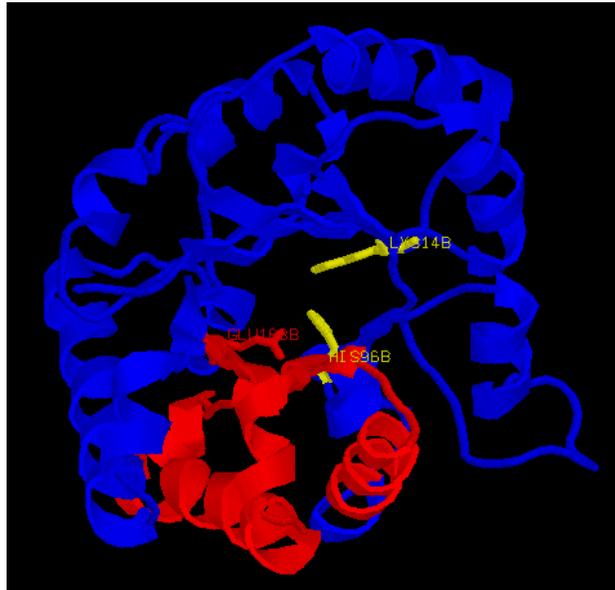


Figura 31. Representación de la Triosafosfato Isomerasa mutante E110-E168.

1 Dímero. En azul Secuencia de Tb TIM regiones Carboxilo terminal y amino terminal; En rojo secuencia de Tc TIM región central. 2 Monómero donde se muestra los aminoácidos del sitio catalítico en amarillo, en azul Secuencia de Tb TIM regiones Carboxilo terminal y amino terminal; En rojo la región central de Tc TIM.

Capítulo 5

Conclusiones y perspectivas.

Conclusiones

- Los fragmentos de la construcción se obtuvieron por ensayos de PCR, logrando unir cada uno satisfactoriamente variando la concentración de cada fragmento y las condiciones de termociclador.
- La secuencia de aminoácidos teórica y la secuencia de aminoácidos experimental son idénticas.
- Las características de la construcción E110-E168, el vector pGEM-T easy y las células *E. coli* BL21DE3-pLys permitieron la sobreexpresión de la proteína.
- Para la purificación se necesitaron dos columnas, una de exclusión molecular Sephacryl-300 y otra de intercambio iónico Mono-Q. A diferencia de los protocolos establecidos para Tb TIM (Borchert et al 1992) y Tc TIM (Ostoa-Soalma et al, 1997).
- La quimera tiene un 24.9% de actividad biológica con respecto a la proteína de Tc TIM.
- La quimera tiene un 25.8% de actividad biológica con respecto a la proteína de Tb TIM.
- La quimera desnaturalizada tiene 25% de actividad con respecto a la quimera nativa.

- La datos de fluorescencia intrínseca demuestran que la proteína es reversible 91%.
- La quimera tiene un porcentaje de reversibilidad mayor 91% que Tb TIM que presenta 64% en estructura, pero tiene un menor porcentaje de reversibilidad que la enzima de Tc TIM que presenta 97% de reversibilidad.
- La quimera es irreversible, aunque recupera el 91% de fluorescencia intrínseca solo recupera el 25% de actividad.

Perspectivas

- Realizar mutaciones puntuales dentro de la región central de la quimera, para poder descifrar el papel de esta dentro de el plegamiento.
- Hacer ensayos más detallados de estructura secundaria terciaria y cuaternaria.
- Hacer ensayos de renaturalización a diferentes concentraciones de desnaturalizante para obtener el patrón de plegamiento de la proteína.
- Cristalizar la quimera.
- Probar la inhibición por fármacos diseñados para inhibir a Tc TIM y Tb TIM.

REFERENCIAS.

Anfinsen C. B. 1973. **Principles that Govern the Folding of Protein Chains.** *Science.* 181, 223-230.

Beaucamp, N., Hofmann, A., Kellerer, B., and Jaenicke, R. (1997) **Dissection of the gene of the bifunctional PGK-TIM fusion protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: Design and characterization of the separate triosephosphate isomerase.** *Protein Sci.* 6, 2159-2165

Borchert T, Prat K, Zeelen J, Callens M, Noble M Opperdoes F, Michels P, Wierenga R. 1992. **Overexpression of trypanosomal triosefosfate isomerase in *Escherichia coli* and characterisation f a dimer-interface mutant;** *Eur. Biochem.* 211, 703-710

Cháñez-Cárdenas María Elena, Fernández-Velasco D. Alejandro, Vázquez-Contreras Edgar, Coria Roberto, Saab-Rincón Gloria, and Pérez-Montfort Ruy. 2002. **Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma brucei*: Identification of Intermediates and Insight into the Denaturation Pathway Using Tryptophan Mutants.** *Arch Biochem Biophys.* Vol. 399, No. 2, March 15, pp. 117–129.

Cháñez-Cárdenas María Elena, Pérez-Hernández Gerardo, Sánchez-Rebollar Brenda Guadalupe, Costas Miguel, and Vázquez-Contreras Edgar. 2005. **Reversible Equilibrium Unfolding of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* in Guanidinium Hydrochloride Involves Stable Dimeric and Monomeric Intermediates.** *Biochemistry.* 44, 10883-10892.

Creighton T. E. 1996. **Proteins: Structure and Molecular Properties.** 2da. Edición. Editorial W. H. Freeman and Company. New York, E. U. A. 507 pp.

Hill D. J., M. J. Mio, R. B. Prince, T. S. Hughes, J. S. Moore, **Chemical Reviews** 2001, 101, 3893.

Dill K. A. y H. S. Chan. 1997. **From Levinthal to Pathways to Funnels.** *Nature.* 4, 10-19.

Gokhale, R. S., Ray, S. S., Balaram, H., and Balaram, P. (1999) **Unfolding of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase in urea and guanidinium chloride: Evidence for a novel disulfide exchange reaction in a covalently cross-linked mutant.** *Biochemistry* 38, 423-431

Kauzmann W. 1959. **Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation.** *Adv. Protein Chem.* 14, 1-63.

Knowles J R. 1991. **Enzyme catalysis: not different, just better.** *Nature.* Mar 14;350: 121-124.

Lambeir, A. M., Backmann, J., Ruiz-Sanz, J., Filimonov, V., Nielsen, J. E., Kursula, I., Norledge, B. V., and Wierenga, R. K. (2000) **The ionization of a buried glutamic acid is thermodynamically linked to the stability of *Leishmania mexicana* triose phosphate isomerase.** *Eur. J. Biochem.* 267, 2516-2524.

Levinthal, C.J.1968 *Chim Phys.* 65, 44-55.

Maldonado E, Soriano-García M, Moreno A, Cabrera N, Garza-Ramos G, de Gómez-Puyou M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R. 1998. **Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes.** *J Mol Biol.* 283:193-203.

Mathews CK, Hole K E, Ahem K G. 2002. **Bioquímica.** 3ra edición. Addison Wesley. 414.

Nelson D. L. y M. M. Cox. 2000. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3ra. edición. Editorial Worth. Nueva York, E.U.A. 1152 pp.

Ostoa-Saloma Pedro, Garza- Ramos Georgina, Ramirez Jorge, Becker Ingeborg, Berzunza Myriam, Landa Abraham, Gomez-Puyou Armando, Tueno de Gomez-Puyou Marieta, Perez-montfort Ruy. 1997. **Cloning, expresión, purification, and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi***. *Eur. J Biochem*, 244, 700-705

QIAprep **Miniprep Handbook** 03/2003.

Reardon D, Farber GK. 1995. **The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins**. *FASEB J*. Apr;9(7):497-503.

Rietveld, A. W., and Ferreira, S. T. (1996) **Deterministic pressure dissociation and unfolding of triosephosphate isomerase: Persistent heterogeneity of a protein dimer**. *Biochemistry* 35, 7743-7751.

Straus Donald, Rainest Ronald, Kawashimat Eric, Knowlest Jeremy R., And Gilbert Walter. 1985. **Active site of triosephosphate isomerase: *in vitro* mutagenesis and characterization of an altered enzyme**. *Biochemistry*. April.82: 2272-2276.

Vázquez-Contreras, E., Zubillaga, R., Mendoza-Hernández, G., Costas, M., and Fernández-Velasco, D. A. (2000) **Equilibrium unfolding of yeast triosephosphate isomerase: A monomeric intermediate in guanidine-HCl and two-state behavior in urea**. *Protein Pept. Lett.* 7, 57-64

Voet D. y J. G. Voet. 1992. **Bioquímica**. Editorial Omega. Barcelona, España. 1315 pp.

Wetlaufer D. B. 1973. **Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins**. *PNAS*. 70, 697-701.