



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS.

DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE LA REVERSIBILIDAD DEL PLEGAMIENTO DE
UNA MUTANTE DE LA REGIÓN CARBOXILO
TERMINAL DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA
(TIM) DE *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA.



LAURA ALEJANDRA YÉPEZ VEGA.

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDGAR VÁZQUEZ CONTRERAS

2007.



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.

Datos del Jurado.

1.Datos del alumno Yépez Vega Laura Alejandra 56555623 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 098198904
2. Datos del Tutor Dr. Edgar Vázquez Contreras
3. Datos sinodal 1 Dra. Maria Elena Chánez Cárdenas
4 Datos sinodal 2 Dr. Mariana Peimbert Torres
5 Datos sinodal 3 Dr. Alejandro Sosa Peinado
6 Datos sinodal 4 Dra. Georgina Garza Ramos
7 Datos del trabajo escrito Diseño, construcción y caracterización de la reversibilidad del plegamiento de una mutante de la región carboxilo terminal de la triosafosfato isomerasa (TIM) de <i>Trypanosoma brucei</i> y <i>Trypanosoma cruzi</i> . 73 p 2007

Esta tesis 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. María Elena Chánez Cárdenas del Laboratorio de Patología Vascular Cerebral del Instituto de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Este trabajo fue apoyado por el proyecto de CONACYT 45024 - M y PAPIIT IN217206, una beca para estudios de tesis de licenciatura fue otorgada por el mismo.

“Todo hombre es como la Luna:
con una cara oscura que a nadie enseña”

Mark Twain.

Dedicatorias.

A mi papá y a mi mamá: Por todo lo que me han dado y lo que ahora soy. Gracias por todo.

*A mis hermanos: Ángeles, Javier y Gaby.
Por las risas, las peleas y todo lo que hemos compartido.*

*A mis niños: Sebastián, Rodrigo, Alfredo, Ximena y Natasha.
Por que todo cambio y lo llenaron de alegría cuando ustedes llegaron.*

!!! Los Quiero Mucho!!!

*A Alan Viguera. Por todo el apoyo, lo que hemos vivido y compartido
Por darme tu hombro para llorar, tus brazos para
apoyarme y una sonrisa para seguir adelante.*

*A Imelda Rentaría. Por todos estos años de amistad, por ser más que
una amiga y por todo el apoyo a larga distancia.
Te Quiero Mucho Ime.*

*A la vida por darme la oportunidad de llegar a este momento que alguna
vez creí imposible de alcanzar.*

Agradecimientos.

Al Dr. Dr. Edgar Vázquez Contreras por darme la oportunidad y la confianza de realizar este proyecto, por todo el tiempo dedicado y la paciencia.

A la Dra. María Elena Chánez Cárdenas por su invaluable participación y asesoría en esta tesis.

A Dr. Gerardo Pérez Hernández por su valiosa ayuda en la purificación de la mutante G174-K250.

Al Dr. Edgar Vázquez Contreras, la Dra. María Elena Chánez Cárdenas, la Dra. Mariana Peimbert Torres, al Dr. Alejandro Sosa Peinado y Dra. Georgina Garza Ramos por sus revisiones, correcciones y comentarios al presente trabajo.

Al Instituto de Química, UNAM por todo este tiempo, por el uso de sus recursos y equipo.

Al laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manual Velasco Suárez" por el uso interminable de su Termociclador y sus recursos.

Al laboratorio de Físicoquímica de Proteínas de la Facultad de Medicina, UNAM, por permitirme realizar la purificación de la mutante.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias por todas las horas de clase, las prácticas de campo y los buenos momentos que pasamos, por que hicieron muy divertido mi paso por la facultad.

A mis compañeros de laboratorio del Instituto de de Química.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Ciencias.

ÍNDICE GENERAL

Índice General	8
Índice de Figuras	10
Índice de Tablas	11
Abreviaturas	12
Resumen	13
Capítulo I: Introducción	14
1. Las proteínas	14
1.1. Estructura de las proteínas	15
2. Plegamiento de proteínas	18
2.1. Desnaturalización de proteínas	21
3. La Triosafosfato isomerasa	22
3.1. Mecanismo catalítico de la TIM	22
3.2. Estructura de la TIM	23
Capítulo II: Antecedentes	25
Capítulo III: Hipótesis	27
Capítulo IV: Objetivos	28
Capítulo IV: Métodos	29
1. Construcción de la mutante	29
2. Clonación	32
3. Crecimiento de células y sobreexpresión	33
4. Purificación de la mutante: G174 - K250	33
5. Concentración de proteína	35
6. Determinación de la actividad catalítica	35
7. Desnaturalización de la quimera con clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl)	37

Capítulo VI: Resultados y Discusión	38
1. Diseño y construcción de la mutante	38
2. Clonación	43
3. Crecimiento de células y sobreexpresión de proteína	46
4. Purificación de la mutante G174 - K250	48
5. Caracterización de la quimera al desnaturalizar con Gdn-HCl	51
Capítulo VII: Conclusiones	59
Capítulo VIII: Perspectivas	60
Apéndice A	61
Apéndice B	66
Referencias	68

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Reacción para formar el enlace peptídico	14
2. Organización estructural de proteínas	17
3. Embudo de plegamiento	20
4. Reacción de catálisis de la Triosafosfato isomerasa	23
5. Estructura tridimensional de la TIM	24
6. Diseño de protocolo para la construcción de la mutante	30
7. Reacción acoplada para medir actividad catalítica de la TIM	35
8. Alineación de secuencias de Tb TIM y Tc TIM	39
9. Representación del vector pET-3a	40
10. Amplificación de la quimera	41
11. Digestión Clonación de la quimera	42
12. Clonación de la quimera	43
13. Secuenciación de la mutante	45
14. Representación tridimensional del carboxilo terminal de la mutante	46
15. Sobreexpresión de la mutante G174 - K250	47
16. Gráfica de absorbancias a 280 nm	49
17. Gel purificación II	51
18. Desnaturalización de la mutante	52
19. Desnaturalización de la mutante	53
20. Renaturalización de la mutante	54

ÍNDICE DE TABLAS

1. Patrón de plegamiento para las TIM de <i>T. brucei</i> y <i>T. cruzi</i>	25
2. Programa de termociclador para los fragmentos.....	30
3. Programa de termociclador para la quimera.....	31
4. Comparación en las purificaciones.....	50
5. Análisis del desplegamiento/replegamiento de TIM en Gdn-HCl.....	56

ABREVIATURAS.

A,	agregados
a.a	aminoácidos
CEM,	cromatografía de exclusión molecular
CM,	carboximetil
COOH,	grupo carboxilo
DDT,	Ditiotreitol
DHAP,	Dihidroxiacetona fosfato
DMSO,	Dimetilsulfóxido
E,	Ácido glutámico
EDTA,	Ácido etilendiamin-tetraacético
F,	Fenilalanina
FPLC,	cromatografía líquida de alta presión, del inglés "fast pressure liquid chromatography"
GAP,	Gliceraldehído-3-fosfato
Gdn-HCl,	Clorhidrato de guanidinio
H,	Histidina
HPLC,	cromatografía líquida de alta presión, del inglés "high pressure liquid chromatography"
IF,	fluorescencia intrínseca
K,	Lisina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MES,	(ácido 2-[N-Morfolino] etansulfónico)
NaN₃	Azida de sodio
N₂,	dímero no nativo
N₂*,	dímero nativo
NH₃	grupo amino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés "Polymerase Chain Reaction"
PDB	banco de datos de proteínas del inglés "Protein Data Bank"
PMSF,	Fenilmetilsulfonilfloruro
SCM,	centro espectral de masa, del inglés "Spectral Center of Mass"
SDS-PAGE,	dodecil sulfato de sodio- electroforesis en gel de poliacrilamida
TbTIM,	triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcTIM,	triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA,	Trietanolamina
TED,	amortiguador que contiene TEA, EDTA y DTT
TIM	triosafosfato isomerasa
U₂,	monómero desplegado
W,	Triptófano
WT,	Wild type
2N,	monómeros compactos

RESUMEN.

Las secuencias primarias y estructuras tridimensionales de la Triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* son similares, de los 250 aminoácidos que se pueden comparar entre estas dos proteínas, 74% son idénticos. A pesar del elevado porcentaje de parecido en sus secuencias primarias y de la similitud de sus monómeros, los estudios de plegamiento de estas dos enzimas muestran patrones diferentes: *Tc* TIM presenta un patrón de plegamiento reversible y *Tb* TIM presenta un patrón irreversible en donde se forman agregados.

En este trabajo se presenta la estrategia para la construcción de una proteína quimera de *Tb* TIM (M1-G174) y *Tc* TIM en la región carboxilo terminal (G174 - K250), además se presenta la caracterización estructural de la misma por medio de estudios de fluorescencia intrínseca y de actividad catalítica después de la desnaturalización con clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl). Los resultados obtenidos de los espectros de fluorescencia intrínseca y actividad catalítica al desnaturalizar y renaturalizar a la proteína se compararon con los reportados para las enzimas WT de *Tb* TIM y *Tc* TIM. El análisis de los datos así obtenidos permite suponer que la mutación realizada en el extremo carboxilo terminal de *Tb* TIM podría estar relacionada con la irreversibilidad observada en la Triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei*.

Capítulo I.

INTRODUCCIÓN

1. Las proteínas

Las proteínas (del griego *Proteion*, primero) se forman en el ribosoma a partir de la información contenida en los genes. Son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener Azufre en la cadena lateral o como grupo prostético, en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos.

El carbono alfa, es un vínculo para los cuatro diferentes grupos que conforman a los aminoácidos: el grupo amino, el grupo carboxilo, el grupo R y un átomo de Hidrógeno (Nelson D y M. Cox, 2000). La cadena lateral o grupo R de estas moléculas precursoras puede ser desde un átomo de hidrógeno (glicina), hasta un anillo complejo (triptófano). Existen en la naturaleza 20 aminoácidos comunes que pueden ser constituyentes de las proteínas, cada uno con un grupo R diferente que le confiere propiedades específicas. Los aminoácidos se mantienen unidos en las proteínas mediante enlaces covalentes denominados peptídicos (Figura 1).

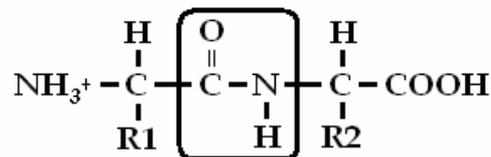


Figura 1. Representación del enlace peptídico (encerrado en el recuadro).

El enlace peptídico se forma por una reacción de condensación durante la cual se elimina una molécula de agua, cuando se unen el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido.

Debido al mecanismo de formación del enlace peptídico, una cadena polipeptídica siempre tiene un extremo amino (NH_3) y un extremo carboxilo (COOH).

1.2. Estructura de las Proteínas

En todas las células, los aminoácidos que se encuentran enlazados por enlaces peptídicos dan lugar a una estructura tridimensional específica. Esta es la disposición tridimensional funcionalmente activa que se conoce como estructura nativa. Para facilitar la descripción de la estructura tridimensional de una proteína se han utilizado los siguientes términos para definir a los diferentes niveles estructurales (Creighton, 1993):

Estructura 1_{aria}. Se refiere a la secuencia lineal de aminoácidos, de la cadena polipeptídica, (Figura 2). El orden de aminoácidos le da su especificidad y también influye en la conformación final y en su función. Este orden es consecuencia de la información contenida en el material genético (ADN). Las cadenas polipeptídicas por lo tanto, difieren entre sí, en el número de aminoácidos que contienen y en la secuencia de sus grupos R.

Estructura 2_{aria}. Consiste en la forma específica en la que se enrollan o pliegan los segmentos de un polipéptido. Puede haber dos tipos de estructuras secundarias: repetitiva y no repetitiva.

- Repetitiva como:

Hélice α . En esta estructura la cadena polipeptídica se pliega en espiral sobre sí misma, (Figura 2), debido a los giros producidos en torno al carbono alfa de cada aminoácido se compone por 3.6 residuos de aminoácidos por vuelta. Esta estructura se mantiene gracias a los enlaces de hidrógeno intercatenarios

formados entre el grupo -NH de un enlace peptídico y el grupo -C=O del cuarto aminoácido que le sigue.

Hoja β plegada. En 1951 Pauling y Corey postularon la existencia de una estructura secundaria diferente en la cadena polipeptídica, la hoja β plegada (Figura 2) (Griffiths *et.al*, 2000). Se forma mediante puentes de hidrógeno entre cadenas vecinas o alejadas en secuencia. Todos los enlaces peptídicos participan en este enlace cruzado, confiriendo así gran estabilidad a la estructura resultante. Existen dos tipos de estructuras Beta:

- Antiparalelas, las cadenas vecinas del polipéptido unidas por enlaces de hidrógeno se disponen en direcciones opuestas.
- Paralelas, en las que las cadenas vecinas del polipéptido unidas por enlaces de hidrógeno se disponen en la misma dirección.

- No repetitiva.

Los *loops*, o asas (Figura 2). Son segmentos que pueden desempeñar el papel de la unión de las estructuras α -hélice y la hoja β -plegada, o la unión de dos o más cadenas polipeptídicas, es un mecanismo mediante el cual una proteína puede actuar flexiblemente en la ejecución de su función biológica.

Estructura 3^{aria}. Es el empaquetamiento tridimensional de la cadena polipeptídica que en la mayoría de las proteínas permite adoptar la conformación nativa (Figura 2), se refiere a la localización en el espacio tridimensional de cada uno de los átomos que conforman a la proteína. Esta conformación se mantiene estable en general por enlaces no covalentes como los electrostáticos (puentes salinos) y los puentes de hidrógeno o bien interacciones de van der Waals que se forman entre las cadenas laterales de los aminoácidos. Para dar más estabilidad a la proteína, se pueden formar enlaces covalentes como los puentes disulfuro, que se forman a través de aminoácidos que contienen azufre, como la cisteína. En la estructura terciaria en general los aminoácidos no polares se sitúan hacia el interior y los polares hacia el exterior

Estructura Cuaternaria. Es la unión de dos o más cadenas polipeptídicas, que pueden ser iguales (homo-oligómeros) o diferentes (hetero-oligómeros). La estructura cuaternaria de la proteína se obtiene después de la asociación u oligomerización de dos o más monómeros.

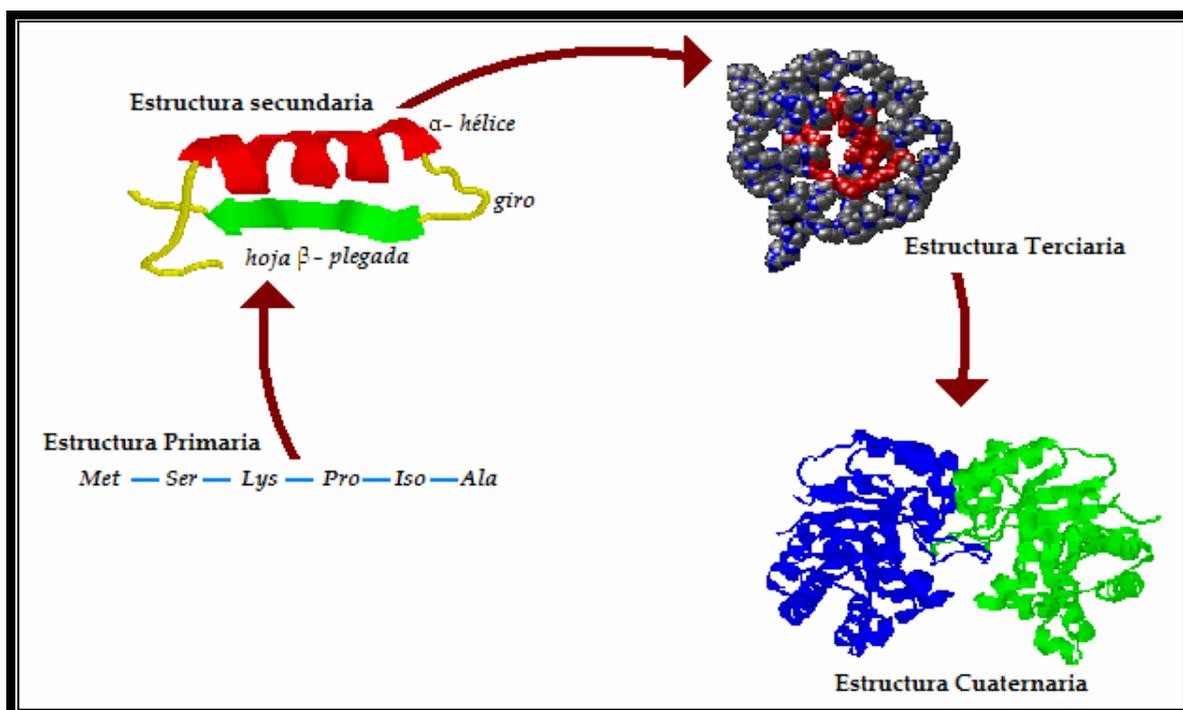


Figura 2. Organización estructural de las proteínas.

Todas las proteínas, como producto final de los genes, conforme se van sintetizando en el ribosoma, van quedando expuestas al solvente, donde, a través del proceso de plegamiento, alcanzan su estructura funcional (Nelson. y Cox, 2000).

2. El Plegamiento de las proteínas

El plegamiento, es la propiedad que tiene la cadena polipeptídica de adoptar una determinada conformación tridimensional estable para desempeñar su función biológica. La cadena polipeptídica se pliega en una conformación que está determinada por la información incluida en la secuencia de los residuos de aminoácidos (Anfinsen, 1973).

El estado nativo de una proteína es la conformación de la cadena polipeptídica termodinámicamente más estable (Dobson, 2003). Se ha observado que el plegamiento de una cadena polipeptídica a una estructura tridimensional es un proceso reversible, que depende de las condiciones del ambiente (Anfinsen, 1973).

Bajo condiciones fisiológicas en el proceso de plegamiento las proteínas son más estables en su conformación nativa que en otras posibles conformaciones. El plegamiento es un proceso rápido, que tarda a lo sumo periodos del orden de milisegundos.

En 1968 Cyrus Levinthal sugirió la existencia de rutas preferenciales de plegamiento (Levinthal, 1968), argumentando que la cadena polipeptídica encuentra su estructura nativa en un período de tiempo extremadamente corto, comparado con el tiempo predicho para un mecanismo de plegamiento por medio de búsqueda aleatoria. Esta observación se conoce como la paradoja de Levinthal.

En la actualidad esto se ha interpretado además como una evidencia de que el plegamiento no es totalmente aleatorio, sino que es un proceso por etapas, que reduce en muchos órdenes de magnitud la búsqueda de conformaciones (Dobson, 2003).

Se han reconocido varias propiedades e interacciones físicas que guían al proceso de plegamiento, como la formación de enlaces disulfuro entre cisteínas o la formación de puentes salinos entre aminoácidos básicos y ácidos, pero en general se acepta que las principales interacciones en el proceso son la hidrofobicidad de las cadenas laterales en un medio acuoso y la formación de puentes de hidrógeno. Como resultado del proceso de plegamiento en medios acuosos, en general estas biomoléculas se empaquetan mostrando hacia el solvente superficies hidrofílicas y ocultando al interior los componentes más hidrofóbicos. En el interior de las proteínas las interacciones de van der Waals son muy importantes para mantener la estabilidad conformacional de las mismas (Pace, 1996).

Para examinar y tratar de entender los detalles del mecanismo de plegamiento se han realizado modelos teóricos por medio de simulaciones computacionales. Un ejemplo es el modelo de embudos de plegamiento, por Leopold, Montal y Onuchic (Leopold PE *et.al*, 1992). Un embudo de plegamiento, (Figura 3) representa las diversas vías que puede tomar una proteína para plegarse. El paisaje de energía o superficie del embudo corresponde a la entropía de cada conformación y puede tener una amplia cantidad de formas diferentes, con colinas o valles, que representan barreras de energía, trampas cinéticas o caminos más directos al estado nativo.

El proceso de plegamiento puede verse como una exploración en un horizonte, (Figura 3). Si partimos de que A y B son proteínas sintetizadas saliendo del ribosoma, entonces para A, la búsqueda es siempre hacia estados de menor energía (N), pero partiendo de B hay que atravesar por intermediarios, o agregados que requieren ser activados para poder llegar a la estructura nativa.

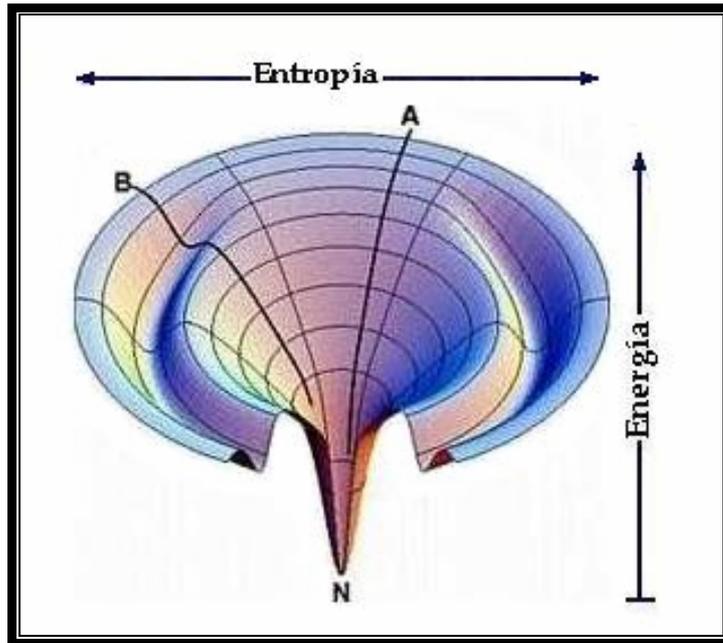


Figura 3. Representación del modelo del embudo propuesto por Leopold, Montal y Onuchic. <http://biochemistry.utoronto.ca>.

La forma del embudo de plegamiento depende tanto de la secuencia de aminoácidos de la proteína, como de las condiciones externas, determinando así el mecanismo de plegamiento.

El plegamiento hacia la conformación nativa es un proceso central para que las proteínas puedan llevar a cabo su función correctamente. En el plegamiento *in vivo*, existen factores auxiliares como chaperonas y catalizadores que asisten al proceso. Sin embargo, estos factores sólo facilitan el plegamiento productivo en el ambiente celular.

2.1. Desnaturalización de proteínas

Dado que el proceso de plegamiento *in vivo* puede llegar a ser muy complicado se han diseñado experimentos para poder estudiar el plegamiento *in vitro*. Se conocen como experimentos de desnaturalización y consisten en ocasionar la pérdida de la estructura tridimensional de la proteína en cuestión.

Se llama desnaturalización de las proteínas a la pérdida de las estructuras secundaria, terciaria y/o cuaternaria. Si tenemos proteínas en disolución y cambiamos de forma notable las condiciones en que suelen encontrarse en su medio biológico, pierden su estructura y por lo tanto su función nativa. Este proceso, llamado reacción de desnaturalización, puede estudiarse en el laboratorio mediante agentes desnaturalizantes: físicos (calor o presión) y químicos (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica). Este proceso puede ser reversible si al variar o al retirar el agente perturbante y se regresa a las condiciones nativas (Dill y Shortle, 1991).

En 1973 Anfinsen mostró experimentalmente que la desnaturalización puede ser reversible para proteínas pequeñas, añadiendo y retirando agentes desnaturalizantes a disoluciones de enzimas que ganaban y perdían su actividad. Demostró así que el plegamiento de una proteína depende exclusivamente de su secuencia de aminoácidos, aunque hoy sabemos que algunas necesitan la ayuda de chaperonas (Voet y Voet, 2002).

3. La Triosafosfato isomerasa (TIM)

La triosafosfato isomerasa se utiliza como modelo para estudiar el plegamiento, en diversos organismos se ha estudiado a nivel tanto estructural como funcionalmente, y estos resultados muestran que esta enzima está altamente conservada a lo largo de la evolución. (Lolis *et.al*, 1990). A la fecha se ha reportado la secuencia de aminoácidos de esta proteína de más de 200 especies. Se conoce la estructura tridimensional de la TIM de: *Bacillus stearothermophilus* (Delboni *et.al*, 1995), *Caenorhabditis elegans* (Symersky *et.al*, 2003), *Oryctolagus cuniculus* (Aparicio *et.al*, 2003), *Entamoeba histolítica* (Rodríguez-Romero *et.al*, 2002), *Escherichia coli* (Noble *et.al*, 1993), *Homo sapiens* (Mande *et.al*, 1994), *Leishmania mexicana* (Williams *et.al*, 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Lolis *et.al*, 1990), *Methanothermus fervidus* (Kohloff *et.al*, 1996), *Plasmodium falciparum* (Velanker *et.al*, 1997), *Gallus gallus* (Banner *et.al*, 1975), *Pyrococcus woesei* (Walden *et.al*, 2001), *Thermoproteus tenax* (Walden *et.al*, 2004), *Thermotoga maritima* (Maes *et.al*, 1999), *Trypanosoma brucei* (Wierenga *et.al*, 1991), *Trypanosoma cruzi* (Maldonado *et.al*, 1998) y *Vibrio marinus* (Alvarez *et.al*, 1998).

3.1. Mecanismo catalítico de la TIM

La triosafosfato isomerasa (TIM), es una enzima glucolítica que cataliza la interconversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehido-3-fosfato (GAP), (Figura 4) reacción que se produce a través de un intermediario enediol (Mathews, *et.al*. 2002).

Esta enzima ha sido considerada como un catalizador perfecto (Knowles, 1991) y se estableció que *in vivo* el paso limitante de la reacción está limitada únicamente por la difusión de los sustratos al sitio catalítico (Blacklow, *et.al*, 1988). Esta reacción determina en gran parte la eficiencia de la glucólisis pues de los productos provenientes de la catálisis de la aldolasa (DHAP y el

GAP) únicamente el GAP continúa en la glucólisis asegurando la ganancia energética.

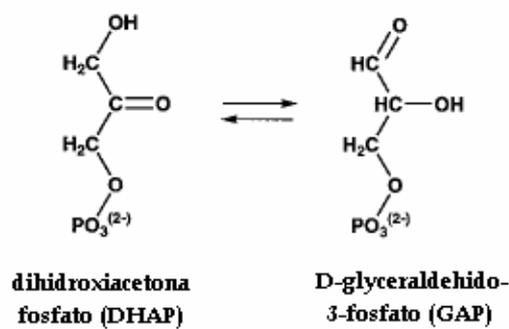


Figura 4. Reacción catalizada por la triosafosfato isomerasa.

3.2. Estructura de la TIM

Se conoce a detalle tanto su estructura como su mecanismo catalítico. La TIM, estudiada en diferentes especies, generalmente es un homodímero de subunidades idénticas en mesófilos excepto en organismos termófilos donde forma tetrámeros (Walden *et.al*, 2001). Cada uno de los monómeros está formado por una secuencia aproximada de 250 residuos de aminoácidos. El peso molecular de cada monómero es de 27 KDa (Straus D *et.al*, 1985). Cada monómero tiene un sitio activo y funciona independientemente del otro, sin embargo sólo la forma oligomérica es activa (Waley, 1973).

La TIM es el prototipo de las proteínas tipo barril α/β . En general, la estructura secundaria está formada por ocho hebras paralelas en el interior de la proteína, que forman una red de puentes de Hidrógeno. Usualmente hay una α hélice, a veces dos, entre cada hebra β vecina (Reardon y Farber, 1995). La secuencia global de la estructura secundaria es por lo tanto un dominio $(\alpha/\beta)_8$ (Figura 5a). Para todas las enzimas de la familia de barriles α/β , el sitio activo está localizado hacia el extremo carboxilo terminal de las hebras beta, a pesar de que las reacciones catalizadas por estas enzimas son ampliamente diferentes.

Los residuos más importantes para la reacción catalítica en la TIM son una Lys, una His y un Glu, para *Tb* TIM son los residuos 13, 95 y 167, mientras que para *Tc* TIM son 14, 96 y 168 (Figura 5b). En todos los barriles se localizan en la zona C-terminal. Estos residuos catalíticos se encuentran conservados a través de la evolución.

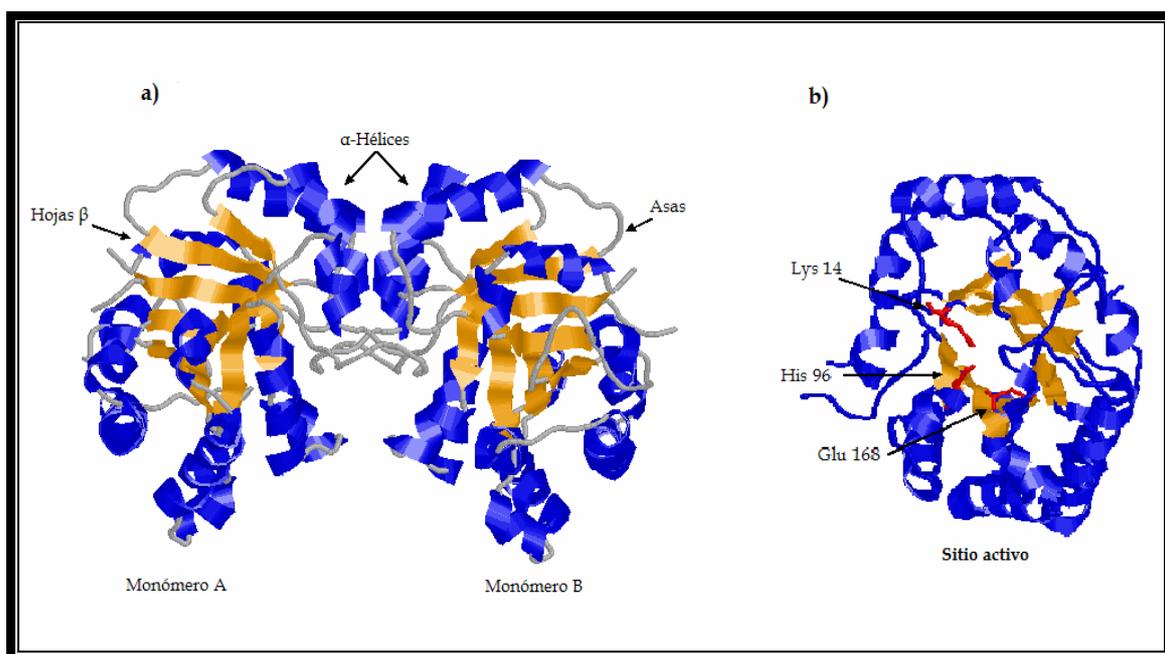


Figura. 5. Estructura tridimensional de la TIM. **a)** Dímero de la TIM, se muestra cada una de las subunidades A y B así como las estructuras que los componen como Hojas β , α -Hélices y asas. **b)** Se muestran los residuos del sitio catalítico de *Tc* TIM en el centro del barril (α/β)₈. Las coordenadas se obtuvieron del archivo 1TCD del PDB (Maldonado, E. et al., 1998).

Capítulo II

ANTECEDENTES

La alineación de las secuencias de aminoácidos de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (*Tc* TIM) y la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (*Tb* TIM) muestran una identidad del 74%. Las estructuras cristalográficas se superponen con un rms de 0.96 Å, y las áreas ocultas al solvente son casi idénticas (Maldonado *et.al*, 1998).

La secuencia primaria está compuesta por 250 residuos de aminoácidos para *Tb* TIM, mientras que *Tc* TIM presenta 251 a.a. Sus patrones de plegamiento, básicamente son iguales, con la diferencia de que *Tb* TIM presenta agregados en los intermediarios lo que la hace irreversible, mientras que *Tc* TIM es completamente reversible (Tabla. 1). La formación de dímeros activos a partir de monómeros desnaturalizados es más eficiente en *Tc* TIM que en *Tb* TIM (Zomosa-Signoret V *et.al*, 2003).

Fuente.	Modelo.	Reversible	Referencia.
<i>T. brucei</i> .	$\begin{array}{cc} \text{A} & \text{A} \\ \uparrow & \uparrow \\ \text{N2} \leftrightarrow \text{N2}^* \leftrightarrow 2\text{N} \leftrightarrow 2\text{U} \end{array}$	No	Chávez-Cárdenas ME <i>et.al</i> , 2002
<i>T. cruzi</i> .	$\text{N2} \leftrightarrow \text{N2}^* \leftrightarrow 2\text{N} \leftrightarrow 2\text{U}$	Si	Chávez-Cárdenas ME <i>et.al</i> , 2005

Tabla. 1. Patrón de plegamiento para las TIM de *T. brucei* y *T. cruzi*. Donde:
 N2: dímero nativo; N2*: dímero NO nativo; 2N: monómeros compactos; U2:
 monómeros desnaturalizados; A: agregados.

En la región carboxilo terminal, específicamente del aminoácido G174 al término de las secuencias de aminoácidos de Tb TIM y de Tc TIM se encuentra un gran número de cambios conservativos y no conservativos. Dado que el patrón de plegamiento de Tc TIM es reversible, en este trabajo se plantea la idea de que esta región puede estar involucrada en la irreversibilidad de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*.

Capítulo III

HIPÓTESIS.

- ✂ Si se sustituye la región del carboxilo terminal de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* por la equivalente de *Trypanosoma cruzi*, es probable que el patrón de plegamiento de *Tb* TIM cambie de irreversible a reversible.

Capítulo IV

OBJETIVOS.

1. Objetivo general.

- ☞ Construcción de una mutante de triosafosfato isomerasa que contiene del aminoácido 1-173 *Trypanosoma brucei* y del 174-250 *Trypanosoma cruzi*, para estudiar el papel de la región carboxilo terminal en la reversibilidad del plegamiento de *Tb* TIM.

2. Objetivos particulares.

- ☞ Diseño de protocolo y construcción de la proteína quimera mutante de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*.
- ☞ Llevar a cabo la clonación, sobreexpresión y purificación de la proteína mutante.
- ☞ Caracterización estructural y funcional de la proteína mutante por fluorescencia intrínseca y actividad catalítica al desnaturalizar con Gdn-HCl.

Capítulo V

MÉTODOS.

1. Construcción de la mutante.

La construcción de la proteína quimera se llevo a cabo mediante tres PRC's. Para obtener el fragmento de Tb TIM (581 pb) se utilizaron los oligonucleótidos T₇ promoter y Rev 180 Tb. Este fragmento codifica para la región N terminal al residuo I173 de Tb TIM (Figura 6. (1)).

Para Tc TIM (267 pb) se utilizaron los oligonucleótidos Fw 180 Tc3 y T₇ terminator, que codifica para la región C terminal (Figura 6. (2)). Una vez obtenidos ambos fragmentos, éstos se unieron utilizando los oligonucleótidos T₇ promoter y T₇ terminator como se observa en la figura 6, (3).

Los oligonucleótidos internos Rev 180 Tb de 12 pb (5'-AATGGCCCAAAC-3') y Fw 180 Tc3 de 30pb (5'-GTCATCGCCTACGAACCCGTTTGGGCCATT -3') se sobrelapan 12 pb. Los oligonucleótidos se diseñaron en una región homologa en las secuencias de Tb TIM y Tc TIM

Los genes de triosafosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* se encuentran clonados en el plásmido pet3a, y fueron donados por el Dr. Ruy Pérez Montfort del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y proporcionados por la Doctora Maria Elena Chánez Cárdenas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez.

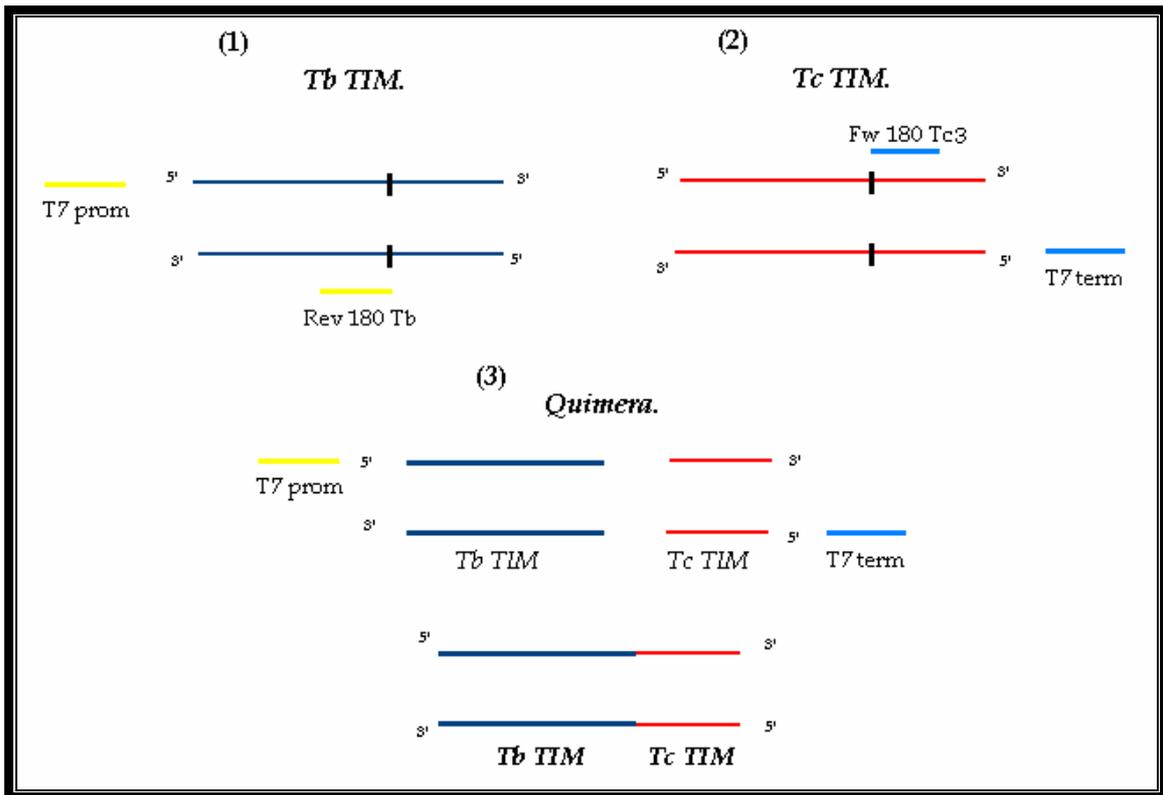


Figura 6. Diseño del protocolo para la construcción de la mutante G174 - K250, utilizando la técnica de PCR.

Para cada reacción de PCR se utilizaron 200 ng de oligonucleótidos, 1.5 mM de dNTPs y 1.5 de mM MgCl₂. Las condiciones de tiempo y temperatura, que se utilizaron para amplificar los fragmentos tanto de *T. brucei* como el de *T. cruzi*, fueron 30 ciclos como se muestra en la Tabla 2:

Calentar	Desnaturalizar	Amplificación	
94.0°C	94.0°C	Annealing	72.0°C
10:00 min	45 seg	42.0°C	30 seg
		45 seg	10:00 min
			4.0°C

Tabla. 2. Programa que se utilizó en el termociclador para obtener los fragmentos de *T. brucei* y *T. cruzi*.

Los fragmentos amplificados se corrieron un gel de agarosa al 1% (p/v) que se tiñó con bromuro de etidio para su detección. El DNA de la banda correspondiente a 581 pb de *T.brucei* y el de 267 pb a *T.cruzi*, y se purificaron posteriormente por medio de un kit de purificación de gel (QIAGEN).

Con el DNA limpio de las dos reacciones, se realizó la amplificación de PCR para unir los fragmentos de *T.brucei* y *T.cruzi* y formar la quimera con un peso de 848pb (Figura 6. (3)). Esta reacción se llevó a cabo con y sin oligonucleótidos externos (T₇ promoter y T₇ terminator) y a dos concentraciones de MgCl₂. 1.5mM y 3.0 mM. Las condiciones utilizadas para la amplificación de la mutante se muestran en la Tabla 3:

Calentar	Desnaturalizar	Amplificación			
94.0°C	94.0°C	<i>Annealing</i>	72.0 °C	72.0°C	
10:00 min	45 seg	42.0°C	30 seg	10:00 min	4.0°C
		45 seg			

Tabla. 3. Programa del termociclador para obtener a la quimera.

El producto del PCR con oligonucleótidos y 3.0 mM de MgCl₂ se purificó mediante un kit de purificación de gel (QIAGEN) para corroborar la identidad de la quimera y el producto de PCR. Se digirió con la enzima Pst I resultando dos fragmentos de 475 pb y 416 pb; y con la enzima Age I dando como resultado dos fragmentos de 630 pb y de 261 pb.

2. Clonación.

La mutante se clonó en el vector pGEM-T Easy Vector® y se transformó en las células *E.coli*/TOP10. Posteriormente se digirió al plásmido pGEM-inserto con la enzima EcoRI para liberar al inserto de la quimera, dando como resultado dos fragmentos de 3015pb y 848pb. El plásmido con el fragmento de 848pb de la mutante se purificó utilizando un kit de purificación de gel (QIAGEN); y se determinó la secuencia para verificar que no hubiera errores en la secuencia mutada.

Para insertar el gen de la Quimera en un plásmido de expresión, se realizó una digestión con las enzimas NdeI y BamHI, tanto del pGEM-quimera como del plásmido pET 3a. Después de digerir, desfosforilar y correr en un gel de agarosa el inserto y el plásmido se ligaron con la enzima T4 ligasa durante toda la noche a 4°C. La reacción de ligación se usó para transformar en células *E.coli*/TOP10, para una mayor eficiencia.

El análisis de restricción con las enzimas NdeI y BamHI, de cinco colonias resultantes de la transformación demostró que cuatro de éstas contenían el inserto de la quimera de 848pb.

Se seleccionó una colonia y se realizó un patrón de restricción. El plásmido con el gen de la quimera se usó para transformar a las células *E.coli* BL21(DE3)plysS. Este plásmido se mandó a secuenciar con los oligonucleótidos T₇ promoter y T₇ terminator, para verificar la secuencia.

3. Crecimiento de células y Sobreexpresión de proteína.

- a) **Precultivo.** 100 mL de medio Luria-Bertani (LB) con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina se inocularon con una colonia fresca de BL21(DE3)plysS pET (Mutante G174 - K250) y ampicilina, el cultivo se mantuvo durante toda la noche a 37°C con agitación constante (250 rpm).
- b) **Cultivo.** El precultivo se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm. Con el botón resuspendido en medio LB se inoculó un litro del mismo medio con el antibiótico, agregando poco a poco hasta alcanzar una densidad óptica de $A_{600} = 0.1$, se dejó crecer a 37°C con agitación constante hasta que alcanzó la fase de crecimiento exponencial en una $D.O_{600} = 0.8-1.0$
- c) **Sobreexpresión.** La mutante se sobreexpresó agregando el inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM con agitación constante (250 rpm) a 37°C durante toda la noche.

4. Purificación de la mutante: G174 - K250.

La purificación se realizó basándose en el protocolo descrito por Borchert y col. (Borchert *et al.* 1993) con ligeras modificaciones.

a) **Cosecha de células.** Una vez teniendo el litro de medio LB con la cepa inducida y sobreexpresada se centrifugó durante 10 minutos a $4260 \times g$ a 4°C .

b) **Fragmentación de células.** El botón de células se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (Apéndice B). Las células se rompieron en una prensa francesa a 1500 *psi*, a 4°C y el lisado se centrifugó a 17000 *xg* por 15 minutos a 4°C

c) El botón resultante se resuspendió en 20 mL de amortiguador de lisis con agitación constante por 30 minutos y se centrifugó a 17000 xg por 15 minutos a 4°C.

d) **Precipitación con sulfato de amonio.** El sobrenadante obtenido se precipitó de 12 a 24 horas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 45% de saturación. Se centrifugó a 17000 xg por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se llevó al 65% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por 12 horas y se centrifugó en iguales condiciones.

e) **Diálisis.** El botón obtenido de la centrifugación se disolvió en 2 mL de amortiguador A (Apéndice B) y se dializó contra el mismo amortiguador realizando dos cambios, de 0.6 L por una hora y 1L por 12 horas.

f) **Cromatografía de intercambio iónico.** La proteína dializada se pasó por una columna de carboximetil sefarosa (CM) en un sistema de HPLC (high pressure liquid chromatography) equilibrada previamente con el amortiguador A. La proteína se eluyó con un gradiente de 25-200 mM de NaCl.

Para las fracciones en las que se evidenció la presencia de la proteína se midió la absorbancia a 280 nm y posteriormente se cuantificó la concentración de la proteína por medio de la prueba de ácido bicinonínico (BCA Pierce®) a 562 nm. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomasie.

Se realizó una segunda purificación basada en el mismo protocolo descrito por Borchert y col. (Borchert *et al.* 1993) con modificaciones para la mutante y para 2L de medio. Se utilizó una columna Superdex 200 se lavó y equilibró previamente con amortiguador A sin sal y se eluyó la proteína con el mismo amortiguador. Nuevamente la concentración de la proteína se determinó por el método (BCA Pierce®) y las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomasie.

5. Concentración de proteína.

La concentración de proteína se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA. Pierce®). Este se basa en la conversión de Cu^{2+} a Cu^+ en condiciones alcalinas. El Cu^+ es detectado por la reacción con BCA, desarrollándose un color púrpura que puede variar de intensidad dependiendo de la concentración de proteína, en este ensayo la producción de Cu^+ es función de la cantidad de proteína. Posteriormente las fracciones que contenían a la proteína mutante se analizaron por SDS-PAGE al 12% de acrilamida teñido con azul de Coomasie.

6. Determinación de la Actividad Catalítica.

Para medir la cantidad de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) que se convierte a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se requiere de un ensayo acoplado a otra reacción enzimática, que permita monitorear un cambio en la absorbencia contra tiempo (Figura 7).

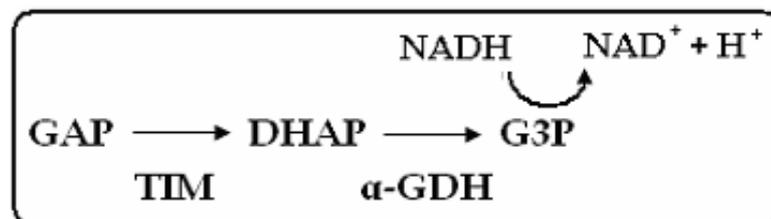


Figura 7. Reacción acoplada para medir la actividad catalítica de la TIM.

Donde: NADH nicotinamida adenín dinucleótido reducido, GAP gliceraldehído 3-fosfato, DHAP dihidroxiacetona fosfato, α -GDH alfa glicerol fosfato deshidrogenasa.

La actividad catalítica de la enzima se determinó a través de la reacción acoplada de la TIM por el cambio de absorbencia a 340 nm, resultado de la

oxidación/reducción del NADH/NAD⁺, donde cada molécula de DHAP que se forma a partir del GAP es convertida por la α -GDH en glicerol 3-P.

El ensayo se realizó a 25°C evaluando el consumo de NADH a 340 nm (longitud de onda a la cual absorbe el NADH) y siguiendo la disminución de la absorbencia de 1 mL de mezcla de reacción que contenía amortiguador TED pH 7.4, GAP 1 mM, α -GDH 2 μ g/ml, NADH 0.2 mM, y 5 ng/mL de proteína (TIM) para determinar la actividad. La reacción se inició con la adición de la TIM a la mezcla.

A partir de las gráficas de absorbencia contra tiempo la actividad específica de la TIM se determinó con la siguiente fórmula: (μ mol/min*mg)

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

Donde: $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22$

7. Caracterización estructural de la quimera al desnaturar con clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl).

Se prepararon las muestras de proteína Tc TIM WT y Quimera para la desnaturación de la siguiente manera:

A. Muestras de proteína nativa (N): Se prepararon a una concentración de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína de Tc TIM WT y la quimera G174 - K250 en amortiguador TED pH 7.4, en un volumen total de 0.5mL.

B. Muestras de proteína desnaturada (D): Se prepararon 0.5 mL de muestra de las proteínas Tc TIM WT y la quimera G174 - K250 a 5.53 M de Gdn-HCl y $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína.

C. Estudios de Fluorescencia intrínseca: Una vez equilibradas las muestras, se cuantificaron los espectros de fluorescencia de las mismas a 280 y 295 nm de excitación, se obtuvieron en un fluorómetro Olis Slit= 0.5nm. Se prepararon las muestras para la renaturalización termoreguladas a 25°C, para determinar si la proteína es capaz de regresar a su estado nativo después de ser desnaturada.

D. Muestras de proteína renaturalizada (R): Generalmente, este experimento se realiza con una concentración de 6 M de Gdn-HCl, pero como la mutante no estaba muy concentrada se modificó la concentración del desnaturante a 5.53 M, se tomó el volumen necesario de las muestras de proteína desnaturada tal que la concentración de éstas quedó a $2.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Tc TIM y la quimera, se utilizó amortiguador TED pH 7.4 para aforar un volumen de 1mL para que la concentración final de Gdn-HCl fuera de 0.1 M.

Muestras de proteína diluida (Dil): A partir de una concentración de 5.53 M de Gdn-HCl y $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína se diluyeron las muestras a un volumen final de 1 mL de TED pH 7.4 y una concentración final de $2.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Tc TIM y quimera y 0.1 M de Gdn-HCl.

Capítulo VI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Diseño y construcción de la mutante.

La estructura tridimensional de la TIM de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* es muy parecida, presentan un 74% de identidad en su estructura primaria con sólo un 13% de cambios no conservativos, es decir, son casi idénticas. Por lo que el diseño para la construcción de la quimera se basó principalmente en una región de las secuencias de Tb TIM y de Tc TIM que va de los aminoácidos 187 al 280. En esta región existe un número considerable de cambios tanto conservativos (9), como no conservativos (8), dando un total de 17 cambios. Como Tb TIM tiene un patrón de plegamiento irreversible, se decidió intercambiar esta región por su homóloga de Tc TIM que tiene un patrón de plegamiento reversible. La sustitución del carboxilo terminal de la TIM de *Trypanosoma brucei* por la de *Trypanosoma cruzi* se llevó a cabo utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (ver Apéndice I-1), PCR por su nombre en inglés.

La mutación de la proteína es en el aminoácido G-174, y a partir del aminoácido 187 y hasta el 250. En la figura 8 se puede apreciar que a partir del aminoácido 163 y hasta el 187 se encuentra una región perfectamente conservada en ambas secuencias. Esto permitió diseñar los oligonucleótidos en esta región para asegurar que el apareamiento de bases fuera más específico.

La región que codifica para los oligonucleótidos internos que se diseñaron se muestran en la figura 8. En amarillo se encuentra el oligonucleótido Rev 180 Tb (12 pb) para obtener el fragmento de Tb TIM, para el fragmento de Tc TIM se diseñó un oligonucleótido más grande, Fw 180 Tc-3 (30 pb) para asegurar el solapamiento de las dos secuencias y poder formar

en el plásmido. Cuando se sintetiza una reacción de PCR con los oligonucleótidos externos se amplifica la región que contiene el sitio de restricción de las enzimas así como la del DNA insertado al vector.

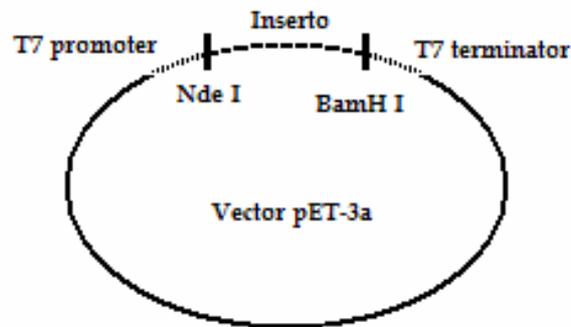


Figura. 9. Representación del vector pET-3a donde se muestra el sitio de unión de los oligonucleótidos T₇ promoter y T₇ terminator (...), además de los sitios de restricción para las enzimas Nde I y BamH I (|) y la región del inserto (- - -).

Como se mencionó en el capítulo de métodos, la construcción de la quimera se llevó a cabo utilizando las secuencias de nucleótidos de la TIM de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*, utilizando la técnica de PCR (ver Apéndice I-1) para amplificar los fragmentos y posteriormente unirlos para formar la mutante.

Los fragmentos de *T. brucei* (581 pb) y *T. cruzi* (267 pb) se amplificaron utilizando una temperatura de alineamiento de 42 °C y una concentración de 1.5 mM de MgCl₂

Una vez teniendo los fragmentos limpios tanto de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* se realizó la amplificación de la quimera de 848 pb, a 40°C, probando diferentes condiciones: (1) con y sin oligonucleótidos y (2) un par de concentraciones de MgCl₂, (3) además se cambió el programa del termociclador para la amplificación (Tabla. 3). Esto último debido a que se intentó amplificar a la mutante con el mismo programa con el que se obtuvieron los fragmentos

de *T. brucei* y *T. cruzi* y no se obtenía la amplificación la quimera de manera satisfactoria, por lo que se alargó el de extensión de 30 seg a 1:30 seg.

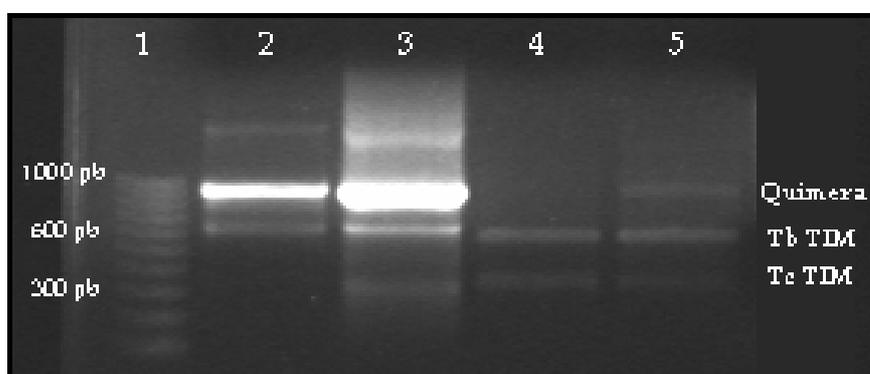


Figura.10. Amplificación de la quimera de 891 pb.

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde se muestra la amplificación de la mutante a 40°C, carril 1 marcador molecular 100 pb, carriles 2 y 3 reacción de amplificación con oligonucleótidos, carriles 4 y 5 reacción de amplificación sin oligonucleótidos. Carriles 2 y 4 amplificación con 1.5 mM de MgCl₂. Carriles 3 y 5 amplificación con 3.0 mM de MgCl₂

En el gel se pueden apreciar las bandas de los fragmentos de Tb y Tc además de la banda correspondiente a la quimera amplificada. Las condiciones en las que se amplificó mejor la quimera fue con los oligonucleótidos externos T₇ promoter y T₇ terminator, con 3.0 mM de MgCl₂ se obtuvo una mayor concentración de quimera. Por otro lado, para las reacciones sin oligonucleótidos, se logró amplificar la mutante, sin embargo el rendimiento fue muy bajo en estas reacciones. Por lo que se decidió trabajar solamente con quimera del carril 3. (ver Figura.10.)

Con la mutante una vez limpia por medio de un kit de purificación de gel (QIAGEN), se realizó un análisis de restricción de la misma con las enzimas Pst I y Age I (Figura 11), resultando dos fragmentos para cada corte: 475 pb y 416 pb para la enzima Pst I, mientras que para Age I 630 pb y 261 pb, estrategia que nos ayudó a verificar que la construcción era correcta. Se utilizaron estas

enzimas de restricción ya que sólo cortan una vez en la secuencia de DNA de la quimera y son específicas para el sitio de corte. PstI corta una vez en el gen de Tb TIM, mientras que AgeI corta una vez en el gen de Tc TIM. Por lo que la quimera tiene un sitio de corte que genera los fragmento mencionados anteriormente.

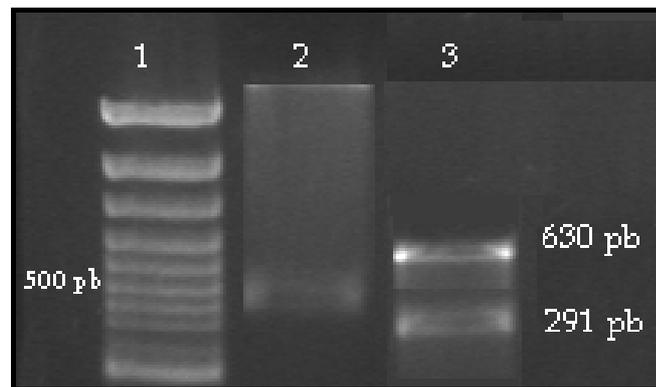


Figura.11. Digestión de la quimera. Carril 1, marcador molecular 100pb. Carril 2, quimera digerida con la enzima Pst I. Carril 3, digestión con la enzima Age I.

2. Clonación.

El inserto o gen quimérico se clonó en el vector pGEM-T Easy Vector® y se transformó en células quimiocompetentes de *E.coli*/TOP10 utilizando dos diferentes proporciones entre el plásmido e inserto así como un control sin inserto.

Se obtuvieron 3 colonias transformadas. Se creció un precultivo para purificar el plásmido. A este DNA se le realizó un patrón de restricción con la enzima EcoRI para liberar al fragmento de la quimera, y revisar el peso molecular de éste; resultando dos fragmento de 3015pb y 848pb.

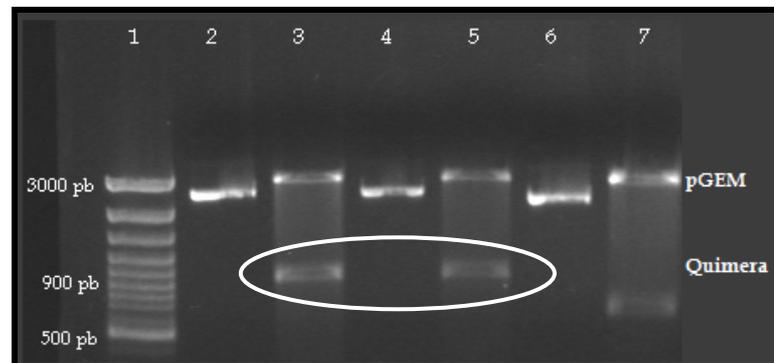


Figura.12. Clonación de la quimera de 848 pb en el plásmido pGEM Easy Vector®. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde se muestra en el carril 1 el marcador molecular 100 pb plus. En los carriles 2, 4 y 6 se muestran el DNA de las colonias seleccionadas sin digerir. En los carriles 3, 5 y 7 las mismas muestras digeridas con la enzima de restricción Eco RI.

En el gel de la clonación de la quimera (Figura.12.) se puede apreciar que dos de las tres colonias que se seleccionaron (carriles 3 y 4) tienen a la quimera, ya que se presenta una banda que tiene un peso molecular de alrededor de 900 pb, mientras que la colonia del carril 7 muestra una banda por debajo de los 900 pb, lo que indica que no es la mutante deseada.

Se eligió una muestra para mandar a secuenciar el DNA con los oligonucleótidos T₇ promoter y T₇ terminator. Con la secuenciación se confirmó la existencia de la quimera. Una vez analizada y confirmada la existencia de la quimera, se liberó a la mutante del plásmido de clonación (pGEM-T Easy Vector®) por medio de la digestión con las enzimas NdeI y Bam HI, y posteriormente se insertó en el plásmido de sobreexpresión pET-3a digerido con las mismas enzimas. Se llevó a cabo la reacción de ligación y la transformación de las células competentes TOP 10 a través de la transformación por choque térmico.

Con la mutante insertada en el vector pET 3a, se mandó nuevamente a secuenciar con los mismos oligonucleótidos, para confirmar la existencia de la quimera, ésta vez se obtuvo la secuencia con los dos oligonucleótidos (T₇ promoter y T₇ terminator) y de esta forma se logró confirmar que la secuencia de la quimera G174 - K250 es correcta y contiene a la mutación en el sitio indicado. El DNA de pET 3a - quimera se purificó para transformar la cepa de expresión BL21 (DE3) pLys S.

En la figura 13 se pueden observar las secuencias alineadas de Tb TIM, la Quimera y Tc TIM. La quimera está formada por la secuencia de *T.brucei* del aminoácido 1 al 173 y por *T.cruzi* a partir del aminoácido 174 hasta el 250.

<i>Tb TIM</i>	-MSKPQP IAAAN <u>W</u> KCN GS QQSLSELIDLFNSTSINH DV QC V VASTFVHLAMTKERLSHPK	59
<i>Quimera</i>	-MSKPQP IAAAN <u>W</u> KCN GS QQSLSELIDLFNSTSINH DV QC V VASTFVHLAMTKERLSHPK	59
<i>Tc TIM</i>	MASKPQP IAAAN <u>W</u> KCN GS ESLLVPLIETLNAATFDH DV QC V VAPTFLHIPMTKARLTNPK	60
<i>Tb TIM</i>	FVIAAQNAIAKSGAFTGEVSLPILKDFGVN W IVLGH S ERRAYYGETNEIVADKVA A AVAS	119
<i>Quimera</i>	FVIAAQNAIAKSGAFTGEVSLPILKDFGVN W IVLGH S ERRAYYGETNEIVADKVA A AVAS	119
<i>Tc TIM</i>	FQIAAQNAITRSGAFTGEVSLQILKDYGIS W VVLGH S ERRLYYGETNEIVAEKVAQACAA	120
<i>Tb TIM</i>	GFMVIACIGETLQERESGRTAVVVL T QIAAIAK L KKADWAKVVIAY <u>E</u> PVWAI G TGKVAT	179
<i>Quimera</i>	GFMVIACIGETLQERESGRTAVVVL T QIAAIAK L KKADWAKVVIAY <u>E</u> PVWAI G TGKVAT	179
<i>Tc TIM</i>	GFHVIVCVGETNEEREAGRTAAVVL T QLAAVAQKLSKEAWSRVVIAY <u>E</u> PVWAI G TGKVAT	180
	174 →	
<i>Tb TIM</i>	PQQAQEAHALIRSWVSSKIGADVAGELRILYGGSVNGKNARTLYQQRDVNGFLVGGASLK	239
<i>Quimera</i>	PQQAQEVHELLRRWVRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDINGFLVGGASLK	239
<i>Tc TIM</i>	PQQAQEVHELLRRWVRSKLGTDIAAQLRILYGGSVTAKNARTLYQMRDINGFLVGGASLK	240
<i>Tb TIM</i>	PEFVDIIKATQ- 250	
<i>Quimera</i>	PEFVEIIEATK- 250	
<i>Tc TIM</i>	PEFVEIIEATK- 251	

Figura.13. Alineamiento de las secuencias de *Tb TIM* y *Tc TIM* con la secuenciación de la mutante. Se muestra la región de la mutación del carboxilo Terminal a partir del sitio de corte en el aminoácido G-174 los aminoácidos aromáticos existentes en éste región y los aminoácidos del sitio catalítico K, H y E se encuentran subrayados.

Dentro de la región carboxilo terminal que se mutó no existen aminoácidos del sitio catalítico, mismos que se encuentran subrayados en el alineamiento de la figura 13, pero existen cinco aminoácidos aromáticos: fenilalaninas 232 y 243, tirosinas 211 y 224 y triptófano 194, que contribuyen para poder seguir el plegamiento/desplegamiento de la proteína por medio de la fluorescencia.

En cuanto a la estructura tridimensional de la zona mutada, se encuentran dos hojas β y cinco α -hélices unidas entre sí por asas, como se puede ver en la figura 14. La región mutada se compone del α -hélice del loop 6, todo el loop 7 y e loop 8 que forman el barril $(\alpha/\beta)_8$ de la TIM.

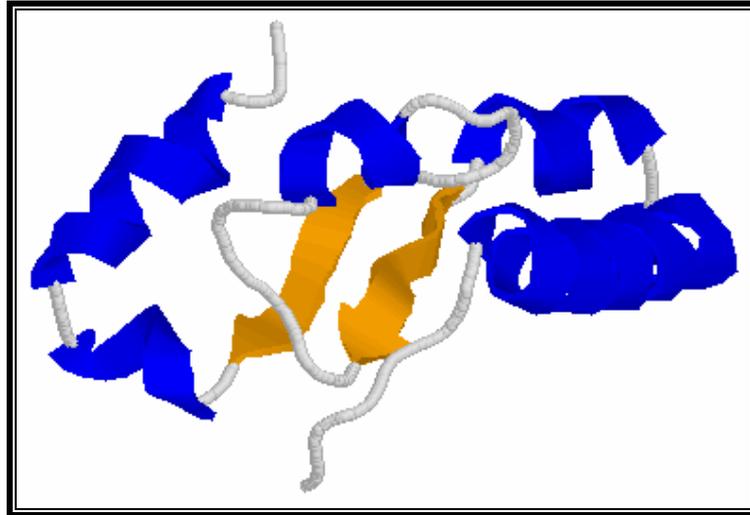


Figura. 14. Representación tridimensional del carboxilo terminal de la mutante G174 - K250

3. Crecimiento de células y Sobreexpresión de proteína.

La quimera G174 - K250 fue sobreexpresada en células BL21 (DE3) pLysS. Se hizo un precultivo inoculado con una colonia fresca que contenía a la mutante y se dejó crecer durante la noche. Con éste se inoculó el medio hasta alcanzar una densidad óptica de 0.1, se dejó crecer hasta que alcanzó la fase de crecimiento exponencial con una densidad óptica de 0.8-1.0. Se indujo la sobreexpresión de la TIM agregando IPTG, induciendo la transcripción de la T7 RNA polimerasa. La expresión de la quimera se realizó a 37 °C con agitación constante.

Se determinó la densidad óptica del medio sin inducir y del medio con la proteína sobreexpresada para poder determinar el volumen de muestra que se sometió al gel, las muestras 1X corresponden al volumen de medio requerido para tener una D.O= 0.025, y las muestras 2X para tener una D.O= 0.05. Esto con el fin de asegurar que se agregara a cada carril el mismo número de células inducidas y no inducidas.

Posteriormente se corrió un gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes y se tiñó con azul de Coomasie (Figura. 15) para observar la sobreexpresión de la TIM antes de empezar la purificación. El gel se corrió con un marcador de peso molecular, la muestra del medio sin inducir y ya inducido con el IPTG 1x y 2x además de un control de Tb TIM pura.

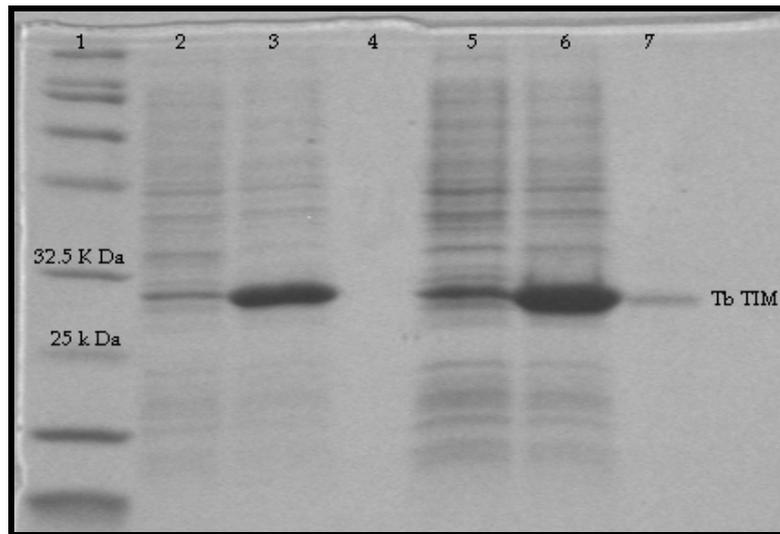


Figura. 15. Sobreexpresión de la mutante G174 - K250. Gel de acrilamida al 12% teñido con azul de Coomasie, en el carril 1 el marcador de peso molecular, en 2 y 5 cultivo sin inducir (1X y 2x respectivamente), 3 y 6 cultivo inducido con IPTG 100 a 0.4 mM (1X y 2x respectivamente). Carril 7 control (Tb TIM pura).

Como se puede observar en la figura 14, existe una pequeña sobreexpresión basal de TIM, sin embargo, es mayor después de inducir con IPTG.

4. Purificación de la mutante. G174 - K250.

Las purificaciones de la proteína G174 - K250 se realizaron de acuerdo al protocolo de reportado para la enzima silvestre de Tb TIM por Borchert y colaboradores (Borchert *et.al.* 1993), ya que la mutante tiene un porcentaje mayor de identidad con Tb TIM.

Se utilizó una columna de intercambio iónico carboximetil sefarosa. La proteína posee una carga positiva a pH 8 y la columna una carga negativa que hace que la TIM se una a ésta última. La proteína se despega de la columna utilizando cloruro de sodio (NaCl) en el amortiguador.

En una primera purificación se siguió el mismo protocolo de purificación reportado para Tb TIM WT y partiendo de un litro de cultivo con la cepa inducida y sobreexpresada. La concentración de la proteína se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA Pierce®) y la pureza de la proteína se determinó por medio de geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Al revisar el gel de acrilamida y la concentración de diferentes fracciones, dedujimos que la proteína se encontraba dispersa por todas las fracciones, por lo que la proteína no se unió a la columna por la concentración de sal del amortiguador (50mM NaCl) con el que se lavó y equilibró la columna y por lo tanto la concentración de las fracciones era muy baja y no se observaban significativamente en el gel.

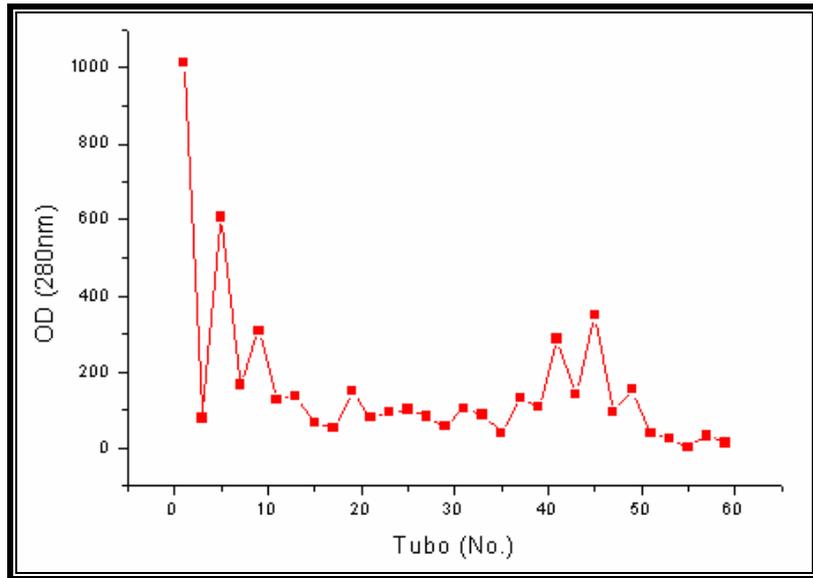


Figura. 16. Gráfica de la absorbancias a 280 nm de las fracciones de la primera purificación.

En la figura 16, se puede apreciar la absorbancia a 280nm de las fracciones obtenidas, existen picos de absorbancia en las fracciones 1 - 23 y en las fracciones 37 - 50 de la purificación, esto indica que la proteína no se pegó a la columna de purificación, por lo que la TIM se encuentra distribuida a lo largo de todas las fracciones. Posteriormente, las fracciones se corrieron en un gel de acrilamida y se observó que la proteína estaba muy diluida puesto que no se alcanzaba a percibir la banda de la TIM.

A partir de los datos obtenidos se decidió realizar una nueva purificación pero ahora partiendo de dos litros de cultivo. Y modificando el protocolo de purificación para asegurar que la proteína se pegara a la columna.

	Purificación I.	Purificación II.
Cultivo inducido y sobreexpresado.	1 L.	2 L.
Amortiguador de lisis.	200 mM NaCl.	0 nM NaCl.
Amortiguador A.	50 mM NaCl.	0 nM NaCl.
Elusión de proteína.	200 mM NaCl.	200 mM NaCl.
Volumen de Elusión.	1 mL.	3 mL.
Columna.	CM sepharose.	CM sepharose.
Equipo utilizado.	HPLC.	FPLC.

Tabla 4. Tabla comparativa de las dos purificaciones que se realizaron.

En la segunda purificación se decidió utilizar un amortiguador sin NaCl, hasta el momento de eluir la proteína, y de esta manera asegurar que la proteína se uniera eficientemente a la columna y saliera concentrada la TIM. El cromatograma resultante mostró dos picos, el primero de las fracciones 2 a la 5, y el segundo de las fracciones 6 a la 10. Se analizaron las fracciones de los dos picos cuantificando la concentración de la proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA. Pierce®) y posteriormente las fracciones de se analizaron con geles desnaturizantes de acrilamida al 12% teñidos con azul de Coomasie, corriendo un control de TIM pura.

Con el gel de la segunda purificación se verificó que las fracciones del segundo pico son las que contenían a la mutante G174-K250. También se observó una banda de contaminación de menor tamaño, por lo que se decidió pasar a la TIM por una columna de filtración en gel Sephadex 200, para de esta manera quitar la banda contaminante (Figura 17).

En el cromatograma de la columna de filtración en gel Sephadex 200 se observó un solo pico en las fracciones 14 a la 19. Las fracciones resultantes se analizaron cuantificando la concentración de la proteína y con geles desnaturizantes de acrilamida al 12% teñidos con azul de Coomasie. La concentración final de la proteína fue de 480 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se obtuvieron 2 mL totales, que se muestran en el gel de la figura 17 en los carriles 6 y 7.

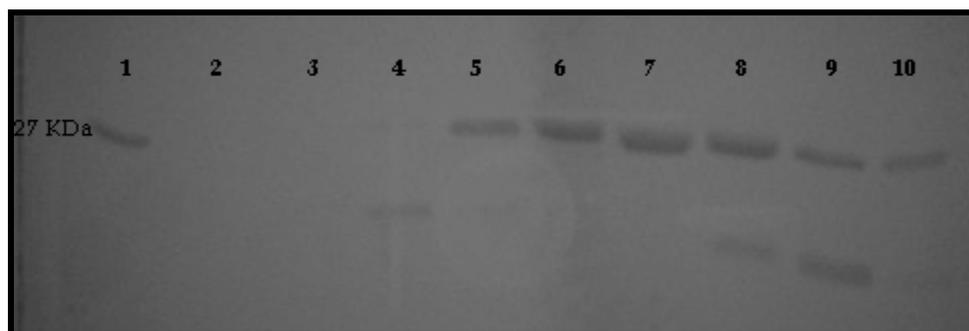


Figura. 17. Gel acrilamida al 12% teñido con azul de Coomasie de la purificación II de la columna de filtración en gel Sephadex 200, en el carril 1 muestra el control de Tb TIM pura, en los carriles 2 - 10 se muestran las fracciones 11 a la 19 respectivamente.

5. Experimentos de desnaturalización de la Quimera G174 - K250 con Gdn-HCl .

Intensidad de Fluorescencia.

Las enzimas Tc TIM y Tb TIM WT y la mutante se desnaturalizaron incubando por una hora en 5.53 M de hidrocloreuro de guanidina, aunque generalmente los experimentos de desnaturalización se realizan incubando a la enzima en 6 M de Gdn-HCl. En nuestro caso fue necesario incubarla en 5.53 M debido a que la proteína mutante no estaba muy concentrada (480 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Para seguir la desnaturalización de la Quimera se midió el cambio en la fluorescencia intrínseca a una longitud de onda de excitación de 280 nm y 295 nm. La concentración de las enzimas fue de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

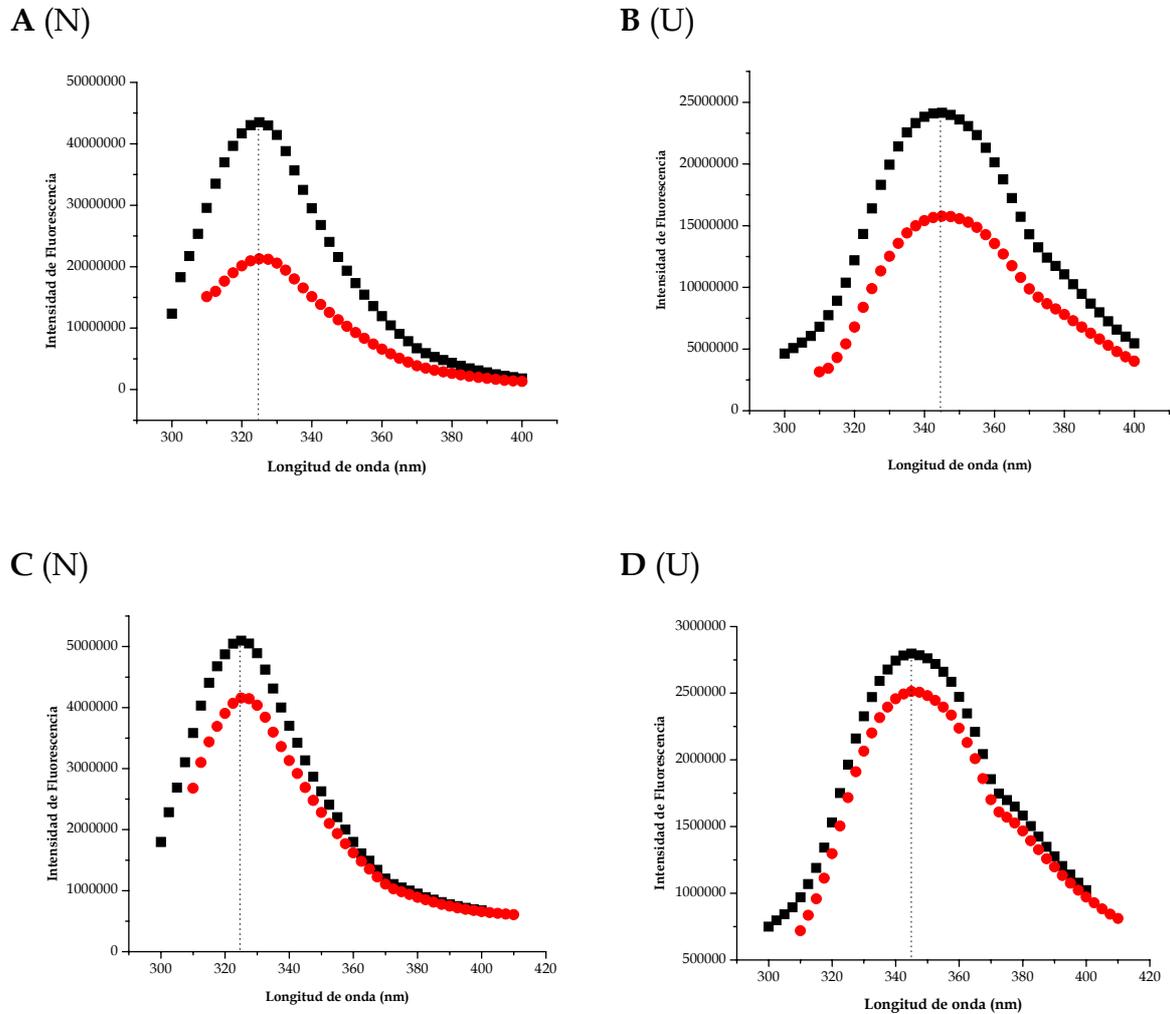


Figura. 18. Espectros de intensidad de fluorescencia para la desnaturalización de la Tc TIM WT y la Quimera.

Espectros de Tc TIM WT **A** y **B**. Espectros de de la Quimera **C** y **D** ■ Espectros obtenidos a una longitud de onda de excitación de 280 nm • Espectros obtenidos a una longitud de onda de excitación de 295 nm. Los espectros de fluorescencia **A** y **C** se obtuvieron a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TIM en TED 20/1/1 pH 7 y con espectros **B** y **D** con 5.53 M de GdnHCl.

En la figura 18 se muestran los espectros de desnaturalización para las enzimas Tc TIM WT y la quimera nativa y desnaturalizada. Se puede observar que los espectros a 280 nm y 295 nm siguen el mismo patrón de cambios en fluorescencia.

Los datos de intensidad de fluorescencia obtenidos se normalizaron y obtuvieron los porcentajes para ajustar los espectros de fluorescencia de la enzima WT y de la quimera.

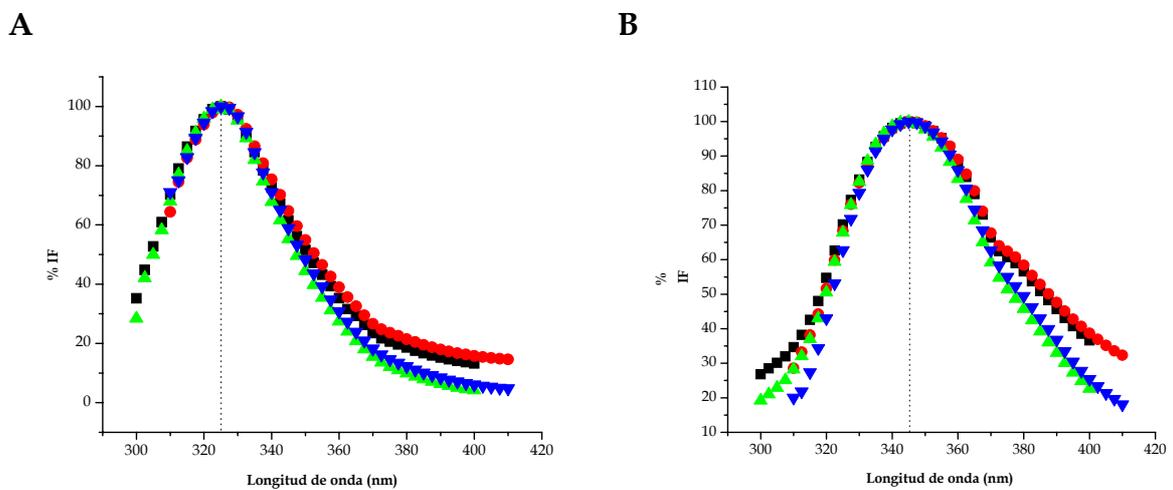


Figura. 19. Espectros de intensidad de fluorescencia normalizados para la desnaturalización de la Tc TIM WT y la Quimera.

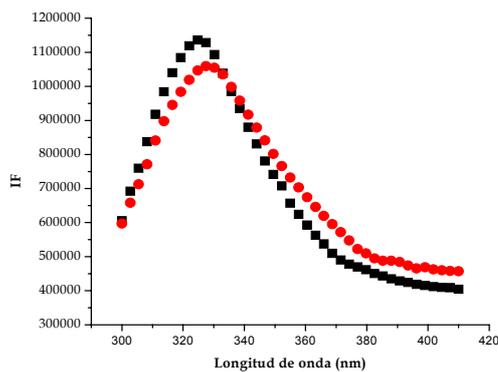
Espectros de proteínas nativas **A** y Espectros de proteínas desnaturalizadas **B**. Espectro de la quimera con excitación a 280 nm ● Espectro de la quimera con excitación a 295 nm. ▲ Espectro de Tc TIM WT con excitación a 280 nm. ▼ Espectro de Tc TIM WT con excitación a 295 nm.

De acuerdo a los espectros de la figura 19 con los datos normalizados, se puede ver que para los espectros de las enzimas desnaturalizadas, el máximo se recorre de 325 nm de las enzimas nativas, a 345 nm.

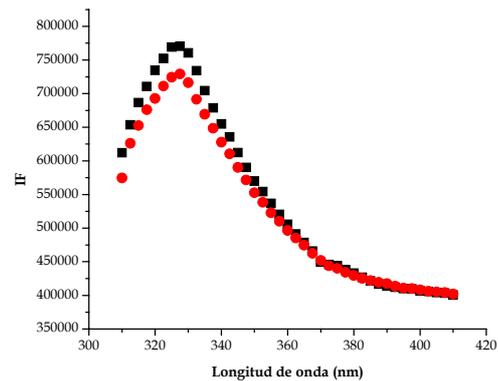
Renaturalización.

Al eliminar los agentes que causan la desnaturalización, la proteína recupera su conformación original (Nativa), a este fenómeno se le conoce como renaturalización. Este estudio permite determinar la actividad catalítica de cada una de las muestras, ya que es necesario determinar si la proteína es capaz de regresar a su estado nativo completamente después de ser desnaturalizada, con el fin de determinar si el proceso es o no reversible. Después de 24 horas de la dilución del desnaturalizante con amortiguador TED pH 7.4 a 25°C se determinó la actividad catalítica de las muestras con 5 ng de proteína (nativa y renaturalizada), así como los espectros de fluorescencia intrínseca a una longitud de excitación de 280 y 295 nm.

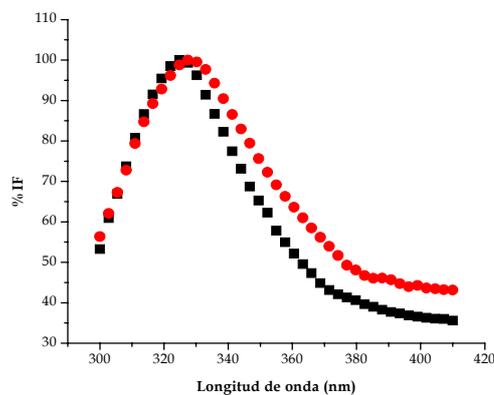
A



B



C



D

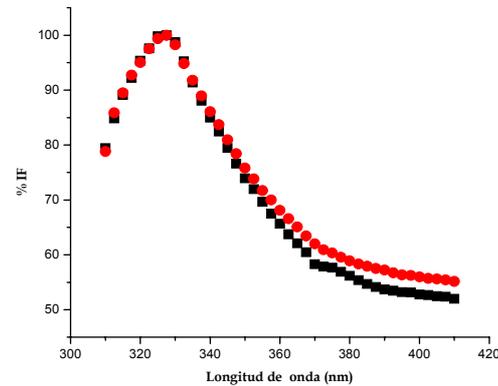


Figura. 20. Renaturalización de la mutante 180 Tb-Tc

Espectros de la quimera sin normalizar los resultados A y B. Espectros de la quimera con los datos normalizados C y D. Espectros de la quimera tomados a 280 nm de

excitación **A** y **C**. Espectros de la quimera tomados a 295 nm de excitación **B** y **D**. ■
Quimera nativa (N) ● Quimera renaturalizada (R)

Con los espectros de renaturalización de la figura 20, se puede observar que la proteína tiene el mismo patrón de cambios en fluorescencia después de la desnaturalización, ya que los espectros de la enzima nativa y renaturalizada son similares.

El máximo de intensidad de fluorescencia (IF) de la proteína mutante está en 325 nm. Después de desnaturalizar con 5.53 Gdn-HCl y renaturalizar con 0.1 M de desnaturalizante residual, se observa que la enzima tiene su longitud de onda máxima de la proteína nativa, por lo que se considera que la enzima es reversible en cuanto a estructura.

Los resultados obtenidos para la desnaturalización con Gdn-HCl de la mutante de Tc y Tb TIM, así como los resultados obtenidos para la renaturalización de las mismas enzimas se muestran en la tabla 5.

	Tb TIM (Chávez-Cárdenas ME <i>et. al.</i> , 2002)			TcTIM (Chávez-Cárdenas ME <i>et. al.</i> , 2005)			Quimera			
	N	U	R	N	U	R	N	U	R	
IF										
280 NM	100 %	19.39 %	64.50 %	100 %	ND	92 %	100 %	49.29 %	93.29 %	
295 NM								67.47 %	94.61 %	
λ_{max}				ND	ND	ND	325 nm	345 nm	325 nm	
280 nm	322 nm	352,3 nm	320 nm	ND	ND	ND	327,50 nm	345 nm	327,50 nm	
CMS				ND	ND	ND				
280 nm	336,7 nm	358 nm	ND				336 nm	350,5 nm	347,6 nm	
295 nm	100 %	(S/A)	65 %	100 %	(S/A)	90 %	342,7 nm	356,1 nm	348,6 nm	
% de		(2 μ g mL)	(2 μ g mL)		(150 μ g mL)	(2,7 μ g mL)	100 %	ND	97.44 %	
Actividad		(50 μ g mL)	5 % (50 μ g mL)				(2,7 μ g mL)		(2,7 μ g mL)	

Tabla 5. Análisis del desplegamiento/ replegamiento de TIM.

Donde: N nativa, U desnaturalizada, R renaturalizada, IF intensidad de fluorescencia, λ max longitud de onda máxima, CMS centro de masa espectral, ND no determinado y S/A sin actividad.

Estado Nativo.

A partir de los espectros de fluorescencia y de los datos obtenidos de la tabla 5, sabemos que la quimera presenta características fluorescentes similares a Tc TIM., Esto nos indica además que la posición de los fluoróforos, y particularmente los triptófanos, se encuentran conservados en estructura primaria y en estructura terciaria.

Estado desnaturalizado.

Los valores de longitud de onda máxima de 345 nm, para la mutante y para Tc TIM (Figura 18), indican que los residuos fluorescentes se encuentran totalmente expuestos al solvente por efecto de la concentración 5.53 M de Gdn-HCl y por lo tanto se encuentran en estado desplegado (U).

Renaturalización.

Después de diluir el desnaturalizante e inducir la reactivación de la mutante G174-K250 incubando a 25 °C durante 24 hrs. Se obtuvo un espectro de fluorescencia casi idéntico al de la enzima nativa, con un máximo de longitud de onda de 325 nm (igual al de el estado nativo). Incluso cuando se excita sólo a los triptófanos a 295 nm la mutante presenta un máximo de longitud de onda también igual al del estado nativo (327.50 nm) Figura 20.

Este comportamiento se confirma con el valor de CME, ya que el valor a 295 nm obtenido en la renaturalización es muy similar al del estado nativo. Esto indica que en el proceso de renaturalización, la TIM mutante adquiere su estructura tridimensional inicial, donde los triptófanos y los demás residuos de aminoácidos que conforman la secuencia primaria, están adquiriendo la posición en la cual se encuentran el estado nativo y que probablemente se están llevando a cabo las interacciones intramoleculares necesarias para que la enzima adquiera la estructura tridimensional que presenta en su estado nativo.

Después de la renaturalización Tb TIM WT sólo recupera un 64.5% de la IF, mientras que Tc TIM recupera 92% y la quimera 94.61%. En cuanto a la actividad catalítica, Tb TIM recupera el 65% de la actividad de la proteína nativa, mientras que Tc TIM recupera 90% y finalmente la quimera tiene una recuperación del 97.44% de la actividad catalítica que es mayor que las enzimas WT.

Lo anterior sugiere que mutante G174-K250 tiene una reversibilidad de plegamiento de casi 100%. Este dato se confirma al evaluar la actividad catalítica. Los resultados obtenidos para la actividad específica del estado nativo y renaturalizado indican que la TIM mutante tiene 97.44% de reversibilidad con respecto a su estado nativo, mientras que Tb TIM recupera el 65% de su actividad y Tc TIM recupera 90%.

Con el cambio en el carboxilo terminal, la mutante adquiere características de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*, ya que al comparar los espectros de fluorescencia y los datos de desnaturalización/renaturalización seguido por fluorescencia intrínseca y la actividad catalítica los resultados obtenidos reflejan que la mutante se asemeja más al comportamiento de Tc TIM.

Finalmente, con el cambio en esta región se puede observar que los residuos de aminoácidos regresan a su posición original al replegarse, por la recuperación en la posición de los fluoróforos intrínsecos y la recuperación de la estructura. De acuerdo a la actividad catalítica cuantificada al replegar a la mutante se puede asegurar que el plegamiento de la mutante (G174 - K250), es reversible. Por lo que se puede pensar que es posible que la región del carboxilo terminal esté relacionada con la irreversibilidad de la Triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*.

Capítulo VII.

CONCLUSIONES.

- ∞ El diseño de los oligonucleótidos fue exitoso, ya que éstos se unieron específicamente en la secuencia de ADN tanto de *Tb* como de *Tc*.
- ∞ Se realizó el diseño, construcción, clonación y sobreexpresión de la quimera.
- ∞ Se cambió el carboxilo terminal de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* por el de *Trypanosoma cruzi*.
- ∞ Se obtuvo la sobreexpresión de la quimera en el sistema pET 3a.
- ∞ La quimera se purificó eficientemente, utilizando el método de Borchert y colaboradores(1993) con modificaciones en la concentración del NaCl.
- ∞ La quimera nativa se caracterizó por fluorescencia y por actividad.
- ∞ Los resultados de reversibilidad indican que los aminoácidos de la quimera regresan a su posición original y la proteína conserva su actividad catalítica.
- ∞ Dada la irreversibilidad de *Tb* TIM, los resultados obtenidos en este trabajo indican que se puede proponer que la región carboxilo terminal de esta mutante juegue un papel importante en la irreversibilidad de la proteína triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei*.

Capítulo VIII.

PERSPECTIVAS.

- ✂ Estandarizar el método de purificación de la mutante para obtener una mayor concentración de proteína y mayor grado de pureza.
- ✂ Caracterización bioquímica de la mutante: cinética enzimática y agentes derivatizantes de cisteínas
- ✂ Continuar con la caracterización del desplegamiento/replegamiento de la mutante, seguida por dicroísmo circular, fluorescencia y actividad catalítica utilizando diferentes desnaturalizantes.
- ✂ Cristalizar y difractar a la mutante para conocer su estructura 3D.
- ✂ Mutantes puntuales sobre la región para ver el papel de cada aminoácido.

Apéndice A.

1. Reacción en Cadena de la Polimerasa. (PCR)

En 1986, K. Mullis, inventó un método para lograr la amplificación *in vitro* de fragmentos de ADN, se denominó de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR, siglas provenientes del inglés *polymerase chain reaction*. (Griffiths *et.al.*, 1999). Esta técnica permite multiplicar ("amplificar" es, en realidad, el término que se ha impuesto) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud.

El método se basa, en su forma más simple en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces (ver la figura AI). La muestra se calienta, en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como desnaturalización. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir la hibridación de cada una de dos cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Se trata de segmentos de ADN de cadena simple, diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir la hibridación, cada uno de estos iniciadores, a los que se denomina oligonucleótidos o primers, deben ser complementarios del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde. En tercer lugar, una enzima ADN polimerasa extiende los primers, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxidonucleótidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquélla a la cual trabaja la enzima ADN polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, hibridación, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de

su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos en cadena da lugar a la amplificación del segmento de ADN delimitado por los *oligos cebadores*.

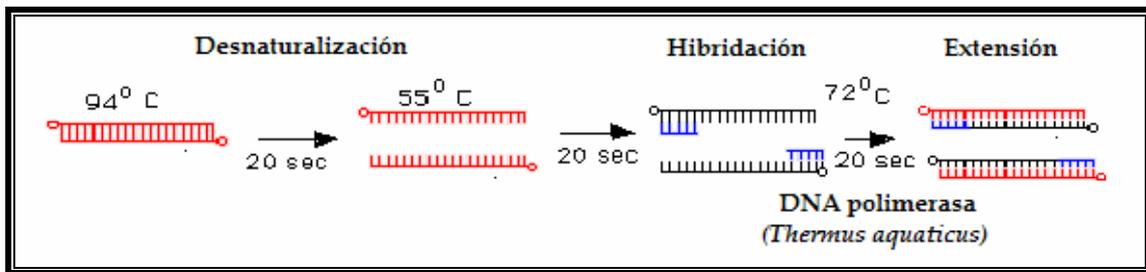


Figura. AI. Para lograr la amplificación de un tramo de ADN, cada ciclo de la técnica PCR incluye tres etapas: a) desnaturalización, durante la cual se separan las dos hebras constituyentes del ADN; b) apareamiento de los "iniciadores" o primers del tramo a replicar; c) extensión de las cadenas de primers gracias a la acción de una enzima ADN polimerasa. La repetición de los ciclos permite multiplicar los tramos de ADN elegidos.

Para replicar el ADN, la técnica PCR hizo uso, en un principio, de la ADN polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*. Pero esta enzima resulta inactivada debido a la alta temperatura requerida para desnaturalizar la doble cadena del ADN, por lo cual debía agregarse enzima fresca al comenzar el tercer paso de cada ciclo. Este inconveniente fue solucionado de manera ingeniosa cuando se la reemplazó por su equivalente de la bacteria "termófila" *Thermus aquaticus*. (Mullis K. B., 1990). La ADN polimerasa de este microorganismo, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75°C y los 80°C y resiste más de dos horas a 93°C . De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados. Una vez finalizada la reacción se habrá logrado fabricar, en pocas horas, gran cantidad de un fragmento génico con un alto grado de pureza. Por otra parte, la técnica PCR es el método de detección de secuencias

de ADN más sensible conocido hasta la fecha: mediante ella resulta posible identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide. Es por lo tanto, un instrumento extremadamente valioso para establecer, por ejemplo, lazos de parentesco.

2. Intensidad de Fluorescencia.

La *Fluorescencia* es el fenómeno en el cual la absorción de luz de una determinada longitud de onda por una molécula fluorescente es seguida por la emisión de luz a mayores longitudes de onda por parte de esta molécula. La distribución de la intensidad dependiente de la longitud de onda que causa la fluorescencia es conocida como espectro de excitación, mientras que la distribución de la intensidad dependiente de la longitud de onda de la energía emitida es conocida como el espectro de emisión.

Las proteínas deben su fluorescencia intrínseca a la presencia de aminoácidos aromáticos, de los 20 usualmente hallados en las proteínas únicamente son fluoróforos el triptófano, la tirosina y la fenilalanina, ya que son los únicos con niveles de fluorescencia suficientes para ser medidos directamente en solución. En la Figura AII se muestran los espectros de absorción y de emisión típicos de estos aminoácidos.

La fluorescencia es muy sensible al ambiente del fluoróforo y, por tanto, los varios parámetros cuantificables (espectros de emisión y excitación, la intensidad y el tiempo de vida) pueden ser afectados de diferentes formas. Por ello, dentro del estudio de las proteínas, la fluorescencia ha sido empleada ampliamente para conocer los cambios de estructura y conformación de estas biomoléculas.

Se trata de una técnica no invasiva, ya que la fluorescencia no interfiere con la integridad de la muestra. Los niveles de excitación lumínica requeridos para generar una señal de fluorescencia son bajos.

Una proteína puede tener uno o varios residuos triptófano. Si tiene uno o dos se facilita la interpretación de los datos espectrales. El Trp es muy sensible al entorno. Es posible observar cambios en los espectros de emisión en respuesta a cambios conformacionales, asociación de subunidades, unión de sustratos, desnaturalización y cualquier situación que afecte el entorno local del anillo indol. El Trp puede ser excitado selectivamente a 295- 305 nm. (para evitar la excitación de la Tirosina)

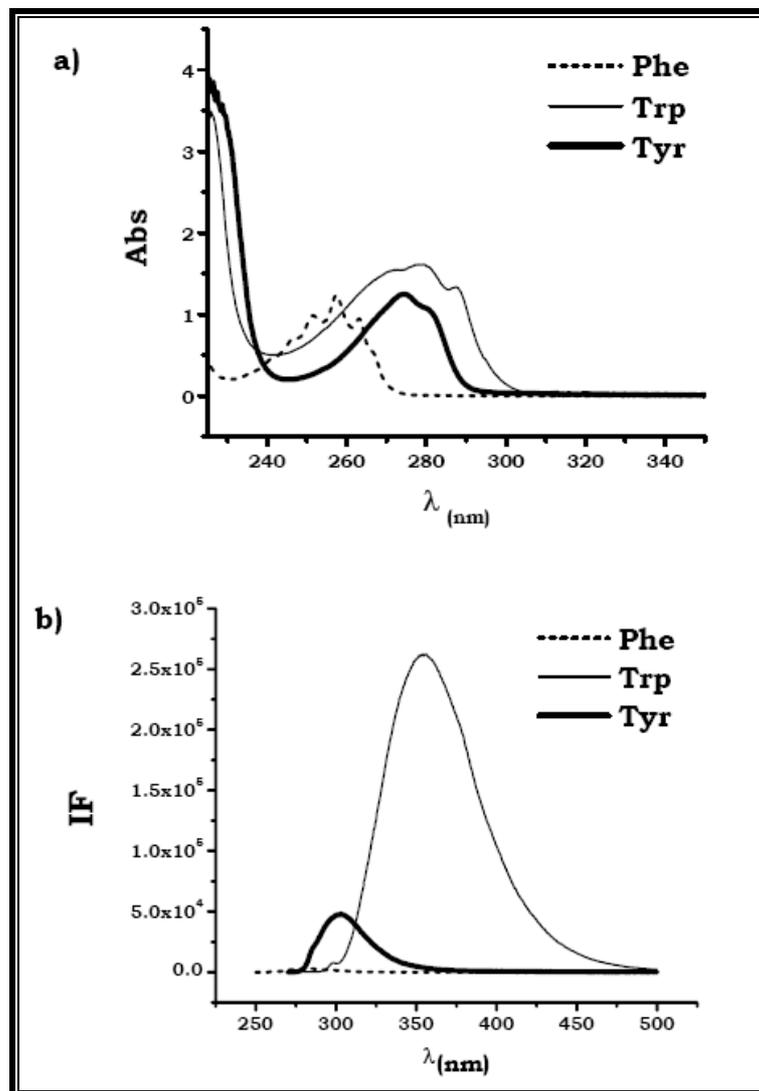


Figura AII. Espectros de a) absorción y b) fluorescencia de los aminoácidos fenilalanina, triptófano y tirosina. En b) fenilalanina fue excitado a 240 nm, triptófano a 270 nm y tirosina a 260 nm. Tomada de: (Martínez, 2004)

Apéndice B.

Reacción de PCR (50 μ L)

DNA molde (Tb/Tc)	1 μ L
Oligonucleotidos: (200 ng/ μ L.)	1 μ L
MgCl ₂	3 μ L
Amortiguador 10x	5 μ L
dNTP's	0.75 μ L
Taq polimerasa	0.2 μ L
Agua	Aforar a 50 μ L

Medio de cultivo Luria-Bertani (LB)

Peptona	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	10 gr
Agua	Aforar a 1L

Amortiguador de lisis. pH 6.5

MES	25 mM
DTT	1 mM
EDTA	1mM
PMSF (en 50 μ l de DMSO)	0.2 mM

Amortiguador A. pH 8.0

TEA	100 mM
NaCl	25 mM
DTT	1mM
EDTA	1 mM
NaN ₃	1 mM

Gel de agarosa al 1%. (25 mL)

Agarosa	0.25 gr
Amortiguador TAE	25 mL
50x Tris/ Acido acetico/ EDTA	
Bromuro de etidio	2 µL

Gel de acrilamida desnaturalizante a 12% de 1.5mm.

Reactivo	Gel Concentrador	Gel Separador
Acrilamida 30%/bis 0.8%	444 µL	3.0 mL
Tris HCl/SDS 4x pH 8.8	-	1.9 mL
Tris HCl /SDS 4x pH 6.8	300 µL	-
H ₂ O	1 mL	2.5 mL
Persulfato de amonio 10%	28 µL	112 µL
TEMED	5 µL	5.0 µL

REFERENCIAS.

Alvarez WJ, Zelen JP, Mainfroid V, Rentier-Delrue F, Martial JA, Wyns L, Wierenga RK, Maes D. 1998. **Triosephosphate isomerase of the Psychrophilic Bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties.** *J. Biol. Chem.* 273: 2199-2206.

Anfinsen CB. 1973. **Principles that Govern the Folding of Protein Chains.** *Science.* 181: 223-230.

Aparicio R, Ferreira ST, Polikarpov I. 2003. **Closed conformation of the active side loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: evidence of conformational heterogeneity.** *J. Mol. Biol.* 334:1023-1041.

Banner DW, Bloomer AC, Petsco GA, Phillips DC, Pogson CI, Willson IA, Connan PH, Furth AJ, Milmar JD, Offord RE, Priddle DJ, Waley SG. 1975. **Structure of chicken triosephosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution.** *Nature.* 255: 609-614.

Beissinger M y Buchner J. 1998. **How chaperones fold proteins.** *Biol. Chem.* 379; 245-259.

Blacklow SC, Raimes RT, Lim WA, Zamore PD, Nowles JR. 1988. **Triosephosphate isomerase catalysis in diffusion controlled.** *Biochemistry:* 23; 27(4):1158-1167.

Cháñez-Cárdenas Maria 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 TE. 1993. **Protein folding.** 2da edición. Editorial W. H. Freeman and Company. New York, E. U. A.

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

Delboni LF, Mande SC, Rentier-Delrue F, Mainfroid V, Turley S, Vellieux FM, Martial JA, Hol WG J. 1995. **Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase of *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with know three-dimensional structures points to the importanceof hydrophobic interactions.** *Prot . Sci.* 4:2592-2604.

Dill KA y Shortle D. 1991. **Denatured states of proteins.** *Annu Rev Biochem.* 60:795-825.

Dobson CM. 2003. **Protein folding and misfolding.** *Nature.* 18;426(6968):884-890.

Ellis RJ y Pinheiro TJ. 2002 **Medicine: danger--misfolding proteins.** *Nature.* Apr 4;416(6880):483-4.

Griffiths A., Gelbart W, Miller J & Lewontin R. 2000. **Genética moderna**. McGraw-Hill. Interamericana de España. 676 pp.

Knowles JR. 1991. **Enzyme catalysis: not different, just better**. *Nature*. Mar 14;350: 121-124.3

Kohloff M, Dahm A, Hensel R. 1996. **Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea**. *FEBS Lett*. 383: 245-250.

Leopold PE, Montal M, Onuchic JN. 1992. **Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 15;89(18):8721-5.

Levinthal C. 1968. **Are there Pathways for Protein Folding?** *J.Chim. Phys*. 65: 44-45.

Lolis E, Albert T, Davenport RC, Rose D, Hartman FC, Petsco GA. 1990. **Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution**. *Biochemistry*. 29: 6609-6618.

Lolis E y Petsco GA. 1990. **Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution**. *Biochemistry*. 29: 6619-6625.

Maes D, Zeelen JP, Thanki N, Beauchamp N, Alvarez M, Thi MH, Beckmann J, Martial JA, Wuns L, Jaenicke R, Wierenga RK. 1999. **The cristal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga marítima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures**. *Priteins Struc. Funct. Genet*. 37: 441-453.

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.

Mande SC, Mainfroid V, Kalk KH, Goraj K, Martial JA, Hol WGJ. 1994. **Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase a 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetics disorders and comparison with the trypanosomal enzyme.** *Protein Sci.* 3: 810-821

Martínez Zapién Denise. 2004. **Caracterización de la estabilidad conformacional de la subunidad β de la ATP-sintasa de la bacteria termofílica *Bacillus PS3*.** Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 76.

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

Mullis KB. 1990. **The unusual origin of the polymerase chain reaction** *Scientific American* vol. 262, págs. 56-65.

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

Noble MEM, Celen JP, Wierenga RK. 1993. **Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined a 2.6 Å resolution.** *Acta Crystallogr.* D49: 403-417.

Onuchic JN, Wolynes PG, Luthey-Schulten Z, Socci ND. 1995. **Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 11;92(8):3626-30.

P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson and D. C. Klenk. 1985.

Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, Volume 150;(1):76-85.

Pace CN, Shirley BA, McNutt M, Gajiwala K. 1996 **Forces contributing to the conformational stability of proteins.** *FASEB J.* Jan;10(1):75-83.

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

Rodríguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Kornhauser A, Fernández-Velasco DA. 2002. **Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolítica*.** *J. Mol. Biol.* 322: 669-675.

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.

Symersky J, Li S, Carson M, Luo M. 2003. **Structural genomics of *Caenorhabditis elegans*: triosephosphate isomerase.** *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 51:484-486.

Velanker SS, Ray SS, Gokhale RS, Suma S, Balaram H, Balaram P, Murthy MRN. 1997. **Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug desing.** *Structure.* 5:751-761.

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

Walden H, Bell G B, Russell R J M, Siebers B, Hensel R, Taylor G L. 2001. **Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase.** *J Biol Mol.* 306: 745-757.

Walden H, Taylor G, Lorentzen E, Pohl E, Lilie H, Schramm A, Knura T, Stubble T, Tjaden B, Hensel R, L. 2004. **Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature.** *J Biol Mol.* 342: 861-875.

Waley SG. 1973. **Refolding of triosephosphate isomerase.** *Biochem J.* Sep;135(1):165-72.

Wierenga RK, Noble MEM, Vriend G, Nauche S, Hol WGJ. 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: 295-1015.

Williams JC, Zeelen JP, Neubauer G, Vriend G, Backmann J, Michels PA, Lambeir AM, Wierenga RK. 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: 243-250

Zomosa-Signoret V, Hernández-Alcántara G, Reyes-Vivas H, Martínez-Martínez E, Garza-Ramos G, Pérez-Montfort R, Tuena de Gómez-Puyou, and Gómez-Puyou A. 2003. **Control of the Reactivation Kinetics of Homodimeric Triosephosphate Isomerase from Unfolded Monomers.** *Biochemistry*, 42, 3311-3318 3311